

UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD (LYON I)
UNITÉ D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE
DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

Année 1976 - N° 119

TITRE DE LA THESE

**Evolution des Immunoglobulines
Intestinales et Seriques de la Souris
au cours de la vaccination
par voie orale**

THESE

présentée

à l'Université CLAUDE BERNARD - UNITÉ D'ENSEIGNEMENT
ET DE RECHERCHE DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES,
et soutenue publiquement le 18 Février 1976
pour obtenir le grade de DOCTEUR D'ÉTAT EN PHARMACIE

par

Bernard IVANOFF

née le 13 Octobre 1939 à Saint-Louis (Sénégal)

UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD (LYON I)
UNITÉ D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE
DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

Année 1978 - N° 119

Digitized by the Internet Archive
in 2026

à l'Université CLAUDE BERNARD - Unité d'Enseignement
et de Recherche des Sciences Pharmaceutiques
et soutenue publiquement le 10 Février 1978
pour obtenir le grade de DOCTEUR EN PHARMACIE

SARAH VERRON

née le 13 Octobre 1939 à Saint-Louis (Sénégal)

UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD (LYON I)
UNITÉ D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE
DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

Année 1976 - N° 119

TITRE DE LA THESE

**Evolution des Immunoglobulines
Intestinales et Seriques de la Souris
au cours de la vaccination
par voie orale**

THESE

présentée

à l'Université CLAUDE BERNARD - UNITÉ D'ENSEIGNEMENT
ET DE RECHERCHE DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES,
et soutenue publiquement le 18 Février 1976
pour obtenir le grade de DOCTEUR D'ÉTAT EN PHARMACIE

par

Bernard IVANOFF

née le 13 Octobre 1939 à Saint-Louis (Sénégal)

Année 1976 - N° 119

TITRE DE LA THÈSE

Evolution des immunoglobulines
intestinales et sériques de la souris
au cours de la vaccination
par voie orale



THÈSE

présentée

à l'Université CLAUDE BERNARD - UNITÉ D'ENSEIGNEMENT
ET DE RECHERCHE DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES,
et soutenue publiquement le 18 Février 1976
pour obtenir le grade de DOCTEUR D'ÉTAT EN PHARMACIE

par

Bernard Ivanoff

née le 13 Octobre 1939 à Saint-Louis (Sénégal)

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON I

Président : M. le Professeur D. GERMAIN

Premier Vice-Président : M. le Professeur ELBAZ

Deuxième Vice-Président : M. P. PONCET, Maître-Assistant

Troisième Vice-Président : M. C. BADOR, Etudiant

Secrétaire Général de l'Université : M. J. RAMBAUD, Administrateur civil

UNITES D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE (U.E.R.)

U.E.R. Médicale GRANGE BLANCHE : M. le Pr. D. GERMAIN

U.E.R. Médicale ALEXIS CARREL : M. le Pr. C. GIROD

U.E.R. Médicale LYON-NORD : M. le Pr. J.P. GARIN

U.E.R. Médicale SUD-OUEST : M. le Pr. J. ROBERT

U.E.R. des Sciences Pharmaceutiques : M. le Pr. L. ODDOUX

U.E.R. des Techniques de Réadaptation : M. A. MORGON, Maître de Conférences

U.E.R. de Biologie Humaine : M. le Pr. J.C. CZYBA

U.E.R. d'Education Physique et Sportive : M. A. MILLON, Professeur d'E.P.S.

U.E.R. des Sciences Odontologiques : M. le Dr. R. VINCENT

U.E.R. de Mathématiques : M. le Pr. G. MAURY

U.E.R. de Physique : M. le Pr. R. UZAN

U.E.R. de Chimie et Biochimie : M. le Pr. J. HUET

U.E.R. de Sciences Physiologiques : M. R. FONTANGES, Maître de Conférences

U.E.R. de Physique Nucléaire : M. le Pr. A. SARAZIN

U.E.R. de Mécanique : M. le Pr. J. MATHIEU

I.U.T. 1 : M. le Pr. B. POUYET

I.U.T. 2 : M. J. GALLET, Directeur E.N.S.A.M.

Observatoire de LYON : M. le Pr. J.H. BIGAY

A la mémoire de mon Père

A ma Mère

A mon épouse, à nos enfants

Aux membres de ma famille, à ma belle famille

A notre Président de thèse

Monsieur le Professeur M. CARRAZ

*Professeur de Bactériologie à l'U.E.R. des Sciences
Pharmaceutiques de Lyon.*

Directeur de l'Institut Pasteur de Lyon.

*Nous le remercions du grand honneur qu'il nous fait d'accepter
la présidence de ce jury et le prions de croire à l'expression de
notre respectueuse reconnaissance.*

Aux Membres de notre Jury

Monsieur le Professeur B. DREVON

*Professeur de Pharmacie chimique à l'U.E.R.
des Sciences Pharmaceutiques de Lyon.
Professeur Agrégé du Val de Grâce.*

Tout au long de nos études nous n'avons jamais cessé de bénéficier de sa bienveillance, de son aide et de ses conseils.

Nous le prions de bien vouloir trouver ici l'expression de notre respectueuse reconnaissance.

Monsieur le Médecin en Chef R. FONTANGES

*Maître de Recherches du Service de Santé des Armées.
Maître de Conférences à l'Université Claude Bernard Lyon I.
Chef de la Division de Microbiologie du Centre de Recherches
du Service de Santé des Armées.*

Il a bien voulu nous accueillir dans son laboratoire et nous confier ce thème de recherche.

Pour notre travail et pour l'orientation de notre carrière militaire, nous avons bénéficié largement de ses précieux conseils. Au cours des années passées dans son laboratoire nous avons pu apprécier l'étendue de ses connaissances scientifiques, son dynamisme et son sens de l'efficacité.

Nous le prions de bien vouloir trouver ici le témoignage de notre respectueux attachement et de notre profonde reconnaissance.

Monsieur le Professeur M. SEPETDJIAN

*Professeur de Médecine Préventive et d'Hygiène
à l'Université Claude Bernard Lyon I.*

Nous le remercions d'avoir bien voulu accepter de juger cette thèse et nous lui exprimons notre respectueuse gratitude.

Au Pharmacien Chimiste Principal O. CREACH

Maître de Recherches du Service de Santé des Armées.

Il a suivi à chaque instant la progression de ce travail au cours duquel nous avons largement bénéficié de son aide bienveillante.

Nous lui exprimons ici notre reconnaissance et notre profonde gratitude.

A Madame F. LAVAL

A Monsieur B. MAISTERRENA

pour leur collaboration efficace.

Au personnel civil et militaire de la Division de Microbiologie du CRSSA.

Nous remercions en particulier le Médecin en Chef P. ISOARD et le Médecin en Chef G. LEMERCIER pour l'aide qu'ils nous ont apportée tant en bactériologie qu'en microscopie électronique.

Nous tenons également à remercier Madame J. COULOUMY qui a réalisé avec patience et grande compétence la frappe et la mise en page de cette thèse.

Au Pharmacien Chimiste en Chef Cl. PARADO et à son personnel, en particulier les Pharmaciens Chimistes F.M. PAILLET, J. CUZIAT et J.P. LEFEVRE pour les services qu'ils nous ont rendus.

Nous remercions également Monsieur J. LOPEZ qui a contribué à la réalisation de nos clichés photographiques.

A Monsieur le Médecin Général Inspecteur

Directeur du Service de Santé des Armées.

A Monsieur le Médecin Général
Directeur du Centre de Recherches du Service de Santé des Armées.

A Monsieur le Général
Directeur des Recherches et Moyens d'Essais.

*A Monsieur le Médecin Général Inspecteur Y. MARTIN-SIBILLE
Commandant l'Ecole du Service de Santé des Armées de Lyon.
Ophtalmologiste des Hôpitaux des Armées.*

En témoignage de notre respectueuse reconnaissance.

*Au Médecin en Chef P. GRATALOUP
Commandant en second l'Ecole du Service de Santé des Armées de Lyon.*

Aux cadres et au ~~personnel~~ de l'Ecole du Service de Santé des Armées.

EVOLUTION DES IMMUNOGLOBULINES INTESTINALES ET SERIQUES DE

LA SOURIS AU COURS DE LA VACCINATION PAR VOIE ORALE

EVOLUTION DES IMMUNOGLOBULINES INTESTINALES ET SÉRIQUES DE LA SOURIS AU COURS DE LA VACCINATION PAR VOIE ORALE.

Vaccins buccaux, Immunité intestinale, Immunoglobulines.

Résumé : Une étude a été effectuée pour suivre les variations de l'immunité intestinale chez la souris Balb/c, après vaccination par voie orale contre Salmonella typhimurium.

Il a d'abord été nécessaire de déterminer les conditions optimales de protection de l'animal. Trois types différents de vaccins ont été utilisés, la bactérie pathogène inactivée par la chaleur, un mutant avirulent vivant de la même espèce, enfin, un antigène isolé à partir du surnageant de culture de ce mutant.

L'efficacité de chaque vaccin a ensuite été déterminée en fonction de sa nature, des doses ingérées, du rythme d'administration et du délai séparant la vaccination de l'épreuve. Enfin, l'auteur a recherché s'il existait une relation entre le mode de vaccination et le taux des immunoglobulines intestinales et sériques, soit au moment où les facteurs non spécifiques sont les plus actifs, 10 jours après la vaccination, soit en période de réponse spécifique, c'est-à-dire 30 jours environ après la vaccination.

L'ensemble des résultats obtenus a permis de montrer, d'une part, la supériorité du vaccin vivant et, d'autre part, l'absence de corrélation entre le taux des différentes immunoglobulines et le degré de protection.

IMMUNOGLOBULINS EVOLUTION IN SERUM AND INTESTINAL TRACT OF MICE AFTER VACCINATION BY ORAL ROUTE

Oral immunization, Intestinal immunity, Immunoglobulins.

Summary : The aim of this work was to study the evolution of intestinal immunity in Balb/c mice, after vaccination by oral route against Salmonella typhimurium.

In an attempt to determine the best conditions in mice's immunization, three different vaccines were used; the heat-killed pathogenic bacteria, a live avirulent mutant, and a protective antigen removed from the supernatant culture of this mutant.

The efficiency of each vaccine was determined after changing vaccines doses, and the interval between vaccination and challenge. Then the author has sought whether there was a relation between vaccinal efficiency and intestinal or serum immunoglobulins levels, either at a time when the non specific factors are more efficient, i.e. 10 days after vaccination, or in a specific response period, i.e. about 30 days after vaccination.

The obtained results show, on the one hand the superiority of the live vaccine and protective antigen in regard to the killed one, and, on the other hand, the lack of correlation between the different immunoglobulins levels and the protection afforded by this vaccination; despite the fact that intestinal immunoglobulin synthesis seemed to be the first step of the defense mechanisms in response to antigen given by oral route.

I N T R O D U C T I O N

On peut considérer que les premières tentatives d'immunisation par voie orale remontent à la plus haute antiquité, puisque les anciens Egyptiens essayaient déjà de guérir les sujets souffrant d'infections intestinales en leur faisant absorber les excréments d'autres malades (335).

Mais les débuts des recherches systématiques concernant ce mode d'immunisation ne datent que de la fin du siècle dernier. C'est en effet en 1891 que EHRLICH parvient, pour la première fois, à protéger la souris contre les toxines du ricin, en administrant à cet animal, par voie orale, une certaine quantité de ricine et d'abrine. La même année, METSCHNIKOFF (271) publie un 4ème mémoire sur l'immunité. Il faut cependant attendre 1926 pour que son élève BESREDKA (45) distingue l'immunité locale du système immunitaire général.

Depuis les travaux d'EHRLICH de nombreux auteurs se sont intéressés à la vaccination par voie buccale. On peut citer, par exemple, CHVOSTEK (95) et WOLF (454) en 1908, YOSHIDA (461) en 1909, BRUKNER (76) en 1911, REITER (345) en 1926, DOMINGO (127) en 1932 et MRUGOWSKI (275) en 1942. Dans une étude bibliographique exhaustive consacrée à ce sujet, BREUEL (74) relève 2.227 références pour la période s'étendant de 1891 à 1968. Il souligne que la moyenne annuelle des publications qui est de 20 à 30 avant 1921 et après 1941 s'élève à 140 pour l'année 1927, ce qui reflète l'influence des travaux de BESREDKA. La chute constatée au cours des années suivantes est due essentiellement à deux raisons :

- la première tient au fait que l'on a cru pendant longtemps que les muqueuses étaient imperméables aux antigènes et que les anticorps présents dans les sécrétions externes provenaient d'un transfert des anticorps sériques. Or WALSH (443) a montré, en 1930, que, chez l'animal, les anticorps de la cavité nasale étaient produits localement et que leur titre était plus élevé après une stimulation locale qu'après une vaccination intrapéritonéale. Etudiant la vaccination anticholérique chez le cobaye, BURROW et HAVEN (83) ont également constaté en 1948, que le taux des coproanticorps était indépendant de celui des anticorps sériques et que les premiers ne dérivait pas des seconds par simple transudation.

- la seconde raison est liée au mode habituel d'évaluation de l'efficacité de la vaccination orale, qui consiste, chez l'homme notamment, à suivre l'augmentation du taux des anticorps sériques. Or il est bien connu actuellement, et les travaux de HORNICK (192) comme ceux de PERSHIN (303) le confirment, qu'il n'existe pas de parallélisme entre le taux des anticorps circulants et le degré de protection conféré par la vaccination buccale (295) FAZEKAS de SAINT-GROTH (144) aboutit d'ailleurs aux mêmes conclusions à propos de la vaccination par voie respiratoire. Il montre, en effet, que la résistance à l'infection grippale est indépendante du taux des anticorps sériques, alors qu'elle est en relation étroite avec la concentration en anticorps des sécrétions nasales.

Ces résultats encourageants sont certainement à l'origine du regain d'intérêt que connaît la vaccination par voie buccale depuis 1967. Mais d'autres facteurs ont contribué à cette relance. Il s'agit, en particulier, des succès obtenus grâce à l'utilisation du vaccin antipoliomyélitique vivant, de la découverte par HEREMANS (184) de l'IgA et de son rôle primordial dans les sécrétions externes, des observations faites par PORTER (314), FUBARA (160) et GIRARD (166) montrant que les sécrétions intestinales peuvent intervenir dans l'inactivation de certaines entérobactéries pathogènes.

Des essais systématiques ont alors été effectués avec des vaccins monovalents ou combinés. Il ressort de ces expériences que la souris (244,325,326,327,328,330) ou le rat (278) peuvent être vaccinés efficacement, par voie orale, contre diverses infections bactériennes intestinales. En 1972, l'OMS (296) a consacré un de ses rapports techniques à ce problème, soulignant les nombreuses raisons qu'on avait de s'intéresser à cette forme d'immunisation. Pour RAETTIG (335,336), les avantages de la vaccination par voie buccale peuvent se résumer de la manière suivante :

- 1) le contact de l'antigène avec la muqueuse provoque in situ, la formation d'anticorps capables de neutraliser ultérieurement l'agent pathogène arrivant à ce niveau,
- 2) à côté de la défense spécifique, la vaccination locale stimule l'immunité non spécifique,
- 3) contrairement à la vaccination parentérale qui peut conduire à des réactions d'intolérance ou favoriser des affections latentes, la vaccination entérale ne présente pas de contre indications,
- 4) en cas de catastrophe ou de menace d'épidémie elle se prête mieux à la vaccination de masse, elle ne nécessite pas de personnel spécialisé, elle est plus facilement ac-

ceptée que l'immunisation par injection, enfin, l'immunité qu'elle confère est très rapide,

5) la vaccination par voie orale permet l'utilisation de vaccins secs, de conservation pratiquement illimitée même dans des conditions défavorables (339).

Cependant, sur le plan expérimental, ce mode de vaccination ne possède pas encore de critères d'utilisation et d'efficacité bien définis. Lors du Symposium consacré aux vaccins buccaux qui s'est tenu à Budapest en 1973, il est apparu qu'un certain nombre de questions concernant la dose, la forme d'utilisation la plus satisfaisante ou le rythme de la prise n'étaient pas encore résolues.

Dans le cadre des essais entrepris à la Division de Microbiologie du Centre de Recherches du Service de Santé des Armées pour la mise au point de la vaccination par voie orale, nous avons tenté de répondre aux questions précédentes. Il nous a paru intéressant également de connaître l'évolution des immunoglobulines intestinales et sériques consécutives à cette forme d'immunisation.

Notre travail comprend trois parties :

- la première est consacrée à une étude bibliographique que nous avons elle-même divisée en deux chapitres :
 - le chapitre I concerne la technologie de la vaccination par voie orale et les résultats obtenus jusqu'à présent,
 - le chapitre II traite de l'immunité intestinale et du rôle qu'y jouent les immunoglobulines sécrétoires.
- la seconde partie présente en deux chapitres les recherches que nous avons effectuées sur ce problème :
 - le chapitre I étudie la protection de la souris après vaccination à l'aide de trois vaccins différents, un vaccin vivant, un vaccin tué, un vaccin constitué par une fraction antigénique,
 - le chapitre II a pour but l'étude des variations du taux des immunoglobulines intestinales et sériques après vaccination par voie orale.
 - la troisième et dernière partie est consacrée à la discussion des résultats obtenus.

PREMIERE PARTIE

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I

TECHNOLOGIE ET RESULTATS DE LA VACCINATION PAR VOIE ORALE
CONTRE LES ENTEROBACTERIES

I - TECHNOLOGIE DE LA VACCINATION PAR VOIE ORALE

Si l'immunisation par voie orale offre de nombreux avantages par rapport à la vaccination parentérale, il importe, pour qu'elle puisse supplanter cette dernière, que son efficacité soit démontrée de manière incontestable. Ceci suppose des études systématiques au cours desquelles le choix de l'animal d'épreuve, la forme et la nature du vaccin, mais surtout le critère d'efficacité, constitueront des paramètres essentiels. Nous aborderons successivement l'étude de ces différents facteurs en essayant de dégager les avantages et les inconvénients de chacun. Nous avons résumé dans 4 tableaux bibliographiques, les principales caractéristiques des travaux effectués jusqu'à présent.

1) Espèces utilisées

Les tableaux I, II, III et IV montrent la très grande variété des animaux utilisés pour les essais de vaccination par voie orale. Le choix de l'animal est généralement dicté par le souci de trouver un modèle qui offre un certain parallélisme avec l'infection humaine. Cependant certaines espèces ont été choisies dans un but d'application vétérinaire. La plupart des expériences ont été réalisées sur la souris; mais des essais ont été également pratiqués sur le rat, le singe, le hamster, le lapin, le poulet et le porc.

Un nombre important d'études a été effectué directement sur l'homme, soit au cours de campagnes de vaccination en zone d'endémicité, soit en utilisant des groupes de volontaires comme l'a fait FRETER (158).

Il est évident que le choix de l'espèce conditionnera la nature du test d'efficacité.

2) Le vaccin

a) forme du vaccin : Le vaccin peut être absorbé sous forme solide ou sous forme liquide. L'administration à l'animal d'un vaccin liquide est réalisée à l'aide d'une sonde oesophagienne ou, dans le cas de petits animaux, grâce à une aiguille à pointe mousse fixée à l'extrémité d'une seringue. Un mode opératoire plus simple consiste à

Origine du vaccin	Nature du vaccin	Forme du vaccin Administration	Test d'efficacité	Bactérie d'épreuve	Espèce éprouvée	Auteurs
S. schwarzen- grund	Tué chaleur	Liquide Sonde	Mortalité	E. coli 2 380	Souris	RAETTIG 1971 336
S. typhimurium	Tué chaleur	Liquide Sonde	Numération colonies sur milieu S.S. (broyat de rate)	S. typhimurium	Souris	WALDMAN 1971 441
S. typhimurium	Tué chaleur	Liquide Sonde	Mortalité	S. typhimurium	Souris	RAETTIG 1964 326
S. typhimurium	Tué chaleur	Liquide Sonde	Mortalité	S. typhimurium	Souris	RAETTIG 1971 336
S. typhimurium	Tué chaleur	Liquide soude inhalation rectale	Mortalité	S. typhimurium	Souris	MARWIK 1968 258
S. typhimurium	Tué chaleur	Liquide Sonde	Mortalité	S. typhimurium virulent	Souris	IVANOFF CREACH FONTANGES 1973 199
S. typhimurium	Tué chaleur	Liquide Boisson	Agglutinines HO et Vi		Homme	KAROLCEK 1965 210
S. typhimurium Ty 58	Tué acétone	Tablettes	- coproculture - hémoculture recherche de S. Typhi.		Enfants	CHUTTANI 1973 94
S. typhimurium Ty 2	Tué acétone	Liquide Boisson	- hémagglut. passive - Immunofluo.		Souris	De BARBIERI 1970 25
Sh. flexneri 2A	Tué chaleur	Liquide Sonde	Mortalité	Shigella 2A	Souris	RAETTIG 1971 330,336
Mutants Smd Sh. flexneri 2A	Tué chaleur	Liquide boisson + bicarbonate	- protection coproantic.	Bacille dysen- térique de type homologue	Homme	TERZIN 1971 396
Sh. sonnei	Tué	Granulés dans confiture ou jus de fruit	Protection zone d'endémie		Enfants	GRAHNEIS 1974 174
E. coli 2 380	Tué chaleur	Liquide Sonde	Mortalité	E. coli 2 380	Souris	RAETTIG 1971 336

TABLEAU I - Technologie et résultats de l'immunisation par
voie orale à l'aide de bactéries pathogènes inactivées.

Origine du vaccin	Nature du vaccin	Forme du vaccin Administration	Test d'efficacité	Bactérie d'épreuve	Espèce éprouvée	Auteurs
Mutants de <i>S. enteritidis</i> avirulents Thermo sensible à 37°	Vivant	Liquide Boisson	Mortalité	<i>S. enteritidis</i> virulent	Souris	FAHEY 1970 141 142
<i>S. typhimurium</i> M 206	Vivant	Liquide Sonde	Mortalité	<i>S. typhimurium</i> virulente	Souris	IVANOFF CREACH FONTANGES 1974 201
<i>S. typhimurium</i> Mutant Smd	Vivant	Liquide Boisson	Mortalité	<i>S. typhimurium</i> virulente	Souris	BARON 1960 26
<i>S. typhimurium</i> Smd	Vivant	Liquide Sonde	- sérologique - clinique	<i>S. typhimurium</i> TY 2	Chimpanzés	CVJETANOVIC 1970 118
<i>S. typhimurium</i> TY 2 Smd	Vivant	Liquide Boisson avec et sans bicarbonate	- hémagglut. - anticorps fécaux		Enfants Hommes	MEL 1974 264
<i>Sh. flexneri</i> 2A T 32	Vivant	Liquide Boisson	Guérison		Enfants	ISTRATI 1973 198
<i>Sh. flexneri</i> Smd	Avirulent	Liquide Boisson + lait Prétraitement Bicarbonate	Protection en zone d'endémie Anticorps fécaux		Hommes Enfants	MEL 1974 265
<i>Sh. flexneri</i> 2A Smd	Vivant	Liq. fistule intestinale	Hémaggluti- nation	<i>Sh. flexneri</i> 2 A virulent	Lapin	DENCHEV 1974 122
Mutants Smd <i>Sh. flexneri</i> 2A	Vivants + bicarbonate	Liquide Boisson	Coproanticorps		Hommes	MEL 1965 282
<i>V. cholerae</i> ME 7	Vivant	Liquide adminis. niveau anse intestinale	Immunité antitoxique	Toxine 569 B de <i>V. cholerae</i>	Lapin	BHATTACHARY 1968 47

TABLEAU II - Technologie et résultats de l'immunisation par
voie orale à l'aide de bactéries avirulentes vivantes.

Origine du vaccin	Nature du vaccin	Forme du vaccin Administration	Test d'efficacité	Bactérie d'épreuve	Espèce éprouvée	Auteurs
S. typhi S. paratyphi B	Tué	Pilule	Protection zone d'endémie		Homme	GRAHNEIS 1974 173
S. paratyphi S. typhi	Tué chaleur Tué acétone	Liquide Boisson	Hémaggluti- nation		Enfant, Souris Lapin Poulet	SALETTI 1970 364
S. typhimurium S. enteritidis S. paratyphi A et B	Tué chaleur	Liquide Sonde	Mortalité	S. typhimurium	Souris	RAETTIG 1965 327
S. typhi S. paratyphi A et B	Tué chaleur	Tablettes sucrées broyées dans eau de boisson	- coproanti- corps - anticorps sériques	S. typhi virul. S. typhimurium	Rat blanc	MYNARD 1971 278
S. typhi Ty 2V S. paratyphi A et B	Tué acétone	Tablettes	Protection	S. typhosa	Homme	HORNICK 1971 192
S. schwarzen- grund S. heidelberg S. newport S. blockley	Tué chaleur	Liquide Sonde	Mortalité	Homologue virulent	Souris	KINNE SAFFRAN 1968 217
S. typhi Ty 2 S. paratyphi B	Tué acétone Tué chaleur + phénol	Tablettes	- Immunofluor. - IgA dans fecès		Enfants	PANERO 1972 300
Sh. flexneri 3 Sh. flexneri 16 Sh. sonnei 1	Vivant Atténué	Liquide Sonde	Hémagglutinat. Sérique	Sh. flexneri 2 A	Singe	FORMAL 1966 153
Mutants Smd Sh. flexneri 2A Sh. flexneri 3A	Vivant	Liquide Boisson	Mortalité	Sh. flexneri 2 A S2	Souris	MEL 1965 260
Mutants Smd Sh. flexneri 1 Sh. flexneri 2A Sh. flexneri 3A	Vivant	Liquide Boisson	Coproanticorps		Homme	MEL 1965 261
Sh. flexneri 2A Sh. sonnei	Atténué	Solide Pilules sucrées	Protection Hémagglutinat.		Homme	RUBTSOV 1970 362
V. cholerae V. El Tor V. Inaba V. Ogawa	Tué	Pilule	Hémagglutinat. anticorps fécaux		Homme	DENCHEV 1974 123
V. cholerae T 30 T 34 T 64 T 56	Vivant	Liquide administ. en laparotomie	Anticorps sériques		Lapin	HOWARD 1971 193
E. coli O111 34 E. coli O55 B5 E. coli O86 B7	Tué formol	Tablettes dissoutes dans thé	Protection contre l'entérite		Enfants	KUBINYI 1972 230
E. coli O111 E. coli O55 E. coli O86	Tué formol	Liquide Boisson	Coproanticorps hémagglutinat.		Souris puis enfants	RAUSS 1972 342

TABLEAU III - Technologie et résultats de l'immunisation
par voie orale à l'aide de vaccins associés.

Origine du vaccin	Nature du vaccin	Forme du vaccin Administration	Test d'efficacité	Bactérie d'épreuve	Espèce éprouvée	Auteurs
S. typhimurium (sérum de vacciné)	Sérique	Liquide Boisson	Séro protection	Salmonella typhimurium virulente vivante	Souris	LEVANON 1970 244
S. typhimurium	Antigène total LPS Protoplasme	Liquide Sonde	Mortalité	S. typhimurium	Souris	RAETTIG 1971 333
S. paratyphi A et B S. typhi	Antigènes Vi Antigènes O	Tablettes	Protection	S. typhimurium	Lapin Souris	HATUNCEVA 1974 180
Surnageant culture de S. typhimurium M 206	Antigène	Liquide Sonde	Mortalité	S. typhimurium	Souris	IVANOFF CREACH FONTANGES 1974 203
Vibrio cholerae	Lysats de forme L	Liquide Boisson	Coproanticorps		Lapin	AGARWAL 1972 2
E. coli 9 souches	Extrait antigène purifié au soxicholate	Liquide Boisson	- Hémagglutin. - Immunoglob.		Enfants	GIRARD 1971 167
E. coli O 26	Antigène au désoxycholate	Tablettes	Protection	E. coli	Souris	TRIAU 1970 412
E. coli 2 380	Antigène au désoxycholate	Liquide Boisson	Mortalité	E. coli 0111	Souris	OCKLITZ 1967 256
E. coli O 127	Antigènes d'E. Coli 0127	Liquide Boisson	Protection	E. coli 0127	Souris	KENNY 1974 214
E. coli O 111 E. coli 055	Extrait antigénique	Liquide Seringue	Protection zone d'endémie		Nourrissons	MOCHMANN 1974 272
Vibrio cholerae	Anticorps intestinaux	Liquide Boisson	Mortalité	Choléra	Souris	FUBARA 1973 160
Sh. flexneri 2A Sh. flexneri 3 Sh sonnei	Antigènes méthy de Boivin	Tablettes	Hémagglutinat.		Hommes	KETYI 1974 215

**TABLEAU IV - Technologie et résultats de l'immunisation
par voie orale à l'aide d'antigènes vaccinaux.**

mélanger le vaccin à l'eau de boisson des animaux. Ce procédé est cependant très aléatoire, car il est difficile de déterminer avec précision la quantité de vaccin ingéré ou le taux de survie des bactéries s'il s'agit d'un vaccin vivant.

La forme solide, dans la mesure où elle correspond à l'incorporation d'un vaccin lyophilisé dans des tablettes, des croquettes ou toute autre nourriture, paraît beaucoup plus séduisante. Là encore, il est extrêmement difficile de connaître avec précision la quantité d'antigène absorbé.

b) Nature du vaccin : Divers types de vaccins, comprenant des bactéries pathogènes inactivées, des bactéries avirulentes vivantes ou des fractions antigéniques ont déjà été essayés.

. Bactéries inactivées

Les bactéries tuées par la chaleur, le phénol, l'acétone ou le formol, constituent des vaccins de préparation facile et dont l'emploi ne comporte pas de grands risques; mais leur efficacité, nous le verrons, est très controversée. Il faut également souligner que certaines substances telles que le formol, peuvent entraîner une modification de l'immunité non spécifique lors de la vaccination et que le procédé d'inactivation est susceptible par lui-même d'altérer certains antigènes. RAETTIG (333) a étudié l'influence de la chaleur sur le pouvoir protecteur du vaccin. Les vaccins les plus efficaces sont ceux qui ont été exposés à une température relativement élevée pendant un temps très court.

Les bactéries peuvent être administrées seules ou associées à des adjuvants tels que l'adjuvant de Freund complet ou incomplet qui ont été employés par GRABEN (172). SCHMUDE (367) a utilisé le diméthyl sulfoxyde pour améliorer la pénétration tissulaire du vaccin, mais il n'est pas exclu qu'un tel solvant modifie les qualités de l'antigène.

. Bactéries vivantes

En ce qui concerne les vaccins vivants, il s'agit de bactéries avirulentes, dont il convient d'abord de vérifier l'absence de pouvoir pathogène et de déterminer le seuil de toxicité vis-à-vis de l'animal d'épreuve.

Salmonella typhimurium M 206, par exemple, ne provoque pas de maladie chez la souris à dose élevée, mais présente une certaine toxicité à partir de 10^7 germes. L'inventaire des souches utilisables pour la fabrication de vaccins vivants est assez fourni. On y trouve essentiellement des souches dont le développement chez l'hôte est très limité, tels que les mutants présentant une déficience biochimique (21,22,161), les mutants streptomycino-dépendants (346), les mutants thermo-sensibles (141,142), les mutants de colonies naines (46) ou les hybrides d'espèces différentes (151).

On peut employer également des souches pauvres en antigènes somatiques (13) ou ayant subi des modifications au niveau de ces derniers (mutation S→R) (135), mais également des mutants qui pénètrent difficilement dans les cellules épithéliales, ou qui produisent peu de toxines (133).

Si l'utilisation des bactéries tuées ne pose pas de problèmes majeurs, celle des vaccins vivants nécessite des précautions particulières. Chez l'homme, l'emploi de tels vaccins est subordonné à des exigences qui ont été définies par l'OMS (296).

Ces bactéries doivent

- être incapables de provoquer la maladie et subsister assez longtemps dans les tissus pour produire une forte stimulation immunogène,
- être incapables, dans les conditions normales, de se propager par des moyens naturels à des sujets non immunisés,
- être génétiquement stables (247) de manière à éviter les risques d'un retour à une forme virulente,
- posséder des caractères qui les distinguent facilement des souches virulentes sauvages existant à l'état naturel.

A ces impératifs d'ordre général, s'ajoutent des difficultés d'ordre pratique, en particulier, celle de connaître avec précision la quantité de bactéries vivantes présentes au moment de la vaccination, la numération se faisant à posteriori. L'utilisation de germes vivants lyophilisés permet de lever cette incertitude, mais on se heurte alors au problème délicat du maintien du taux de survie des bactéries après lyophilisation, problème qui a été largement étudié par FONTANGES et Coll. (149) dans le cas d'une souche pesteuse, avirulente, et par DAMJANOVIC (120) dans le cas d'un vaccin vivant antidysentérique.

Enfin, l'acidité gastrique peut diminuer considérablement la viabilité de certaines bactéries; c'est pourquoi on associe parfois aux vaccins vivants, du bicarbonate de sodium.

. Des antigènes provenant de bactéries ont également été essayés comme vaccins buccaux par de nombreux auteurs dont HATUNCEVA (180), FUBARA (160), KINNE-SAFRAN (216, 217) et MOCHMAN (272,273). RAETTIG (333) a étudié comparativement sur la souris l'efficacité de diverses fractions provenant de Salmonella typhimurium; celles-ci comprennent un lipopolysaccharide, un lipide, une protéine, la paroi ectoplasmique et le cytoplasme. Un extrait obtenu à partir d'E.coli à l'aide de désoxycholate a été utilisé par OCKLITZ (286,273) et TRIAU (412) pour immuniser la souris. GIRARD (167) et OCKLITZ (287) se sont également servis de cet extrait pour vacciner des nourrissons.

Des fractions, provenant de ribosomes de Salmonelles se sont révélées capables de protéger l'animal contre une infection expérimentale (VENNEMAN (432)).

Il est certain que les vaccins chimiques qui se prêtent bien à la purification et ne posent pas de problèmes de conservation, présentent, si les premiers résultats se confirment, une solution d'avenir.

c) Quantités administrées : Il est important de déterminer la dose optimale de vaccin pour chaque espèce vaccinée. Mais, en pratique, les essais systématiques se sont limités à la souris. Ainsi RAETTIG (333) travaillant avec des bactéries inactivées, utilise de 10^8 à 10^9 germes chez cet animal et mille fois plus chez l'homme. Dans le cas des bactéries vivantes les doses employées doivent être inférieures, de l'ordre de 10^6 germes, afin d'éviter, soit des phénomènes de toxicité, soit un franchissement de la barrière épithéliale, comme l'a décrit FORMAL (151,152). Aucune règle générale ne peut être donnée en ce qui concerne les antigènes, chacun devant être essayé à différentes doses.

d) Rythme de vaccination : Des essais systématiques effectués sur la souris ont montré que la vaccination quotidienne pratiquée pendant plusieurs jours consécutifs est plus efficace que la vaccination hebdomadaire ou mensuelle. En pratique le rythme de vaccination est variable selon les auteurs, certains utilisent la vaccination quotidienne pendant un semaine, d'autres préfèrent la vaccination biquotidienne pendant 10 jours.

3) Contrôle de l'efficacité du vaccin

Il est important que l'effet protecteur du vaccin puisse être mesuré en fonction de critères significatifs. La meilleure épreuve consisterait à déterminer le pourcentage de survie sur un assez grand nombre d'animaux de laboratoire ayant reçu une dose létale de la bactérie pathogène correspondante. Malheureusement, certaines entéropathies bactériennes, comme la fièvre typhoïde, étant spécifiques de l'homme, il n'est pas toujours possible d'extrapoler les résultats obtenus sur l'animal. Nous ferons donc une distinction entre les essais effectués chez l'homme et ceux réalisés sur l'animal.

a) Chez l'homme :

. Essais contrôlés sur le terrain

Plusieurs campagnes de vaccination par voie orale ont déjà été entreprises au cours de ces dix dernières années par MEL (261), dans des régions où les shigelles sévissent à l'état endémique. L'efficacité de l'immunisation est jugée par la compa-

raison des pourcentages d'individus vaccinés et d'individus non vaccinés échappant à l'infection.

Divers essais de protection contre l'entérite à Escherichia coli ont été également pratiqués chez des enfants en bas âge par KUBINYI (230), GIRARD (167) et RAUSS(342). L'activité du vaccin a été évaluée soit par le calcul du pourcentage d'individus protégés, soit par le dosage des immunoglobulines (314, 394) ou des anticorps agglutinants présents dans les sécrétions intestinales.

. Epreuves sur volontaires

L'administration à des sujets volontaires d'une dose d'épreuve de bactéries pathogènes, constitue le meilleur moyen de contrôle de l'efficacité d'un vaccin humain. De tels essais ont été réalisés avec des salmonelles par HORNICK (190,191,192), GRABEN (172) et POPOVICI (311) et avec des shigelles par TERZIN (396) et REDEY (343). Ils portent obligatoirement sur un nombre limité d'individus et nécessitent des précautions particulières, dont la possibilité d'administrer un antibiotique efficace dès l'apparition des premiers symptômes de la maladie. L'efficacité du vaccin est jugée par CHUTTANI (94) en fonction de l'incidence de la maladie et du nombre de selles contenant des germes.

b) Chez l'animal :

. Les primates, dans la mesure où leur pathologie infectieuse se rapproche de celle de l'homme, semblent particulièrement indiqués pour l'essai des vaccins buccaux humains. Mais ces animaux sont difficiles à manipuler et leur prix de revient ne permet pas d'en sacrifier un grand nombre. On se contente généralement d'observer l'apparition ou l'absence de signes cliniques de la maladie et de doser éventuellement les anticorps sériques ou intestinaux. C'est ainsi, par exemple, qu'ont été déterminées chez le singe l'efficacité d'un vaccin antidysentérique par FORMAL (151,152,153,154) et celle d'un vaccin antityphoïdique par CVJETANOVIC (118).

. Parmi les petits animaux, les souris se prêtent le mieux aux essais systématiques d'efficacité. Faciles à manipuler en grand nombre, elles permettent, après variation de différents paramètres, de choisir les conditions optimales d'épreuve.

C'est avec ces animaux que RAETTIG (333) a établi son "index d'efficacité"

$$\frac{(b-a) 100}{b}$$
, dans lequel b représente le taux de mortalité des souris non vaccinées et a celui des souris vaccinées.

Chez la souris, la dose d'épreuve peut être administrée par voie intrapéritonéale comme le font RAETTIG (333) et CAMERON (87) ou par voie buccale. La première méthode

permet de connaître avec plus de précision la quantité de bactéries pathogènes injectées. De plus, elle donne une réponse plus rapide, généralement en moins de six jours. La seconde méthode paraît cependant mieux indiquée pour les entérobactéries dont la porte naturelle d'entrée est la voie digestive. Elle a l'avantage de soumettre les bactéries aux conditions qu'elles devront subir normalement, en particulier aux variations de pH et aux différentes activités enzymatiques.

L'utilisation de la souris permet également de choisir une dose optimale de bactéries pathogènes après un essai de léthalité. Il faut que la dose administrée, tout en ne donnant pas de phénomènes de toxicité, soit suffisamment élevée pour entraîner un taux de mortalité satisfaisant dans un temps raisonnable. La souche C₅ de Salmonella typhimurium par exemple, administrée par voie orale à des souris Balb/c à la dose de 10⁴ germes tue entre 80 et 100 pour cent des animaux non vaccinés en 8 jours.

C'est aussi sur la souris qu'a été déterminé l'intervalle de temps à respecter entre la vaccination et l'épreuve. Plusieurs auteurs dont RAETTIG (338) et ANDRE (10) ont étudié indirectement la cinétique d'apparition des anticorps intestinaux en fonction du temps. Constatant que le taux de plasmocytes à IgA et de macrophages est maximal vers le 10ème jour suivant la dernière vaccination, ils ont estimé que cette période était la plus significative pour l'administration de la dose d'épreuve. Toutefois, STERN et TRIM (387) ont montré qu'un délai de 21 jours était nécessaire si l'on voulait éviter l'interférence des phénomènes d'immunité non spécifique.

Le taux de protection conféré par la vaccination est le critère d'efficacité généralement choisi par la plupart des auteurs. Toutefois, certains dont WALDMAN (441) préfèrent utiliser des tests indirects comme la numération des bactéries sur un broyat de rate de souris, ou le dosage des anticorps spécifiques par la réaction d'hémagglutination (88,363) ou par technique d'hémolyse, cette dernière étant recommandée par THILO (399).

II - R E S U L T A T S

Les nombreux essais de vaccination par voie orale pratiqués au cours de ces dix dernières années permettent déjà de dresser un premier bilan de l'efficacité des vaccins buccaux contre les infections intestinales.

1) Affections typhoïdiques :

Les études effectuées sur la souris avec des agents pathogènes naturels des rongeurs ont donné des résultats très encourageants (25,224,329,331,364). Etant donné qu'il n'existe aucune corrélation entre le taux des anticorps sériques et le degré d'immunité (HORNICK (192), BUSE (84) et PERSHIN (303)), nous attacherons plus d'importance aux essais portant sur la protection de l'animal ou de l'homme vis-à-vis d'une dose infectieuse de bactéries pathogènes, qu'à ceux qui reposent sur la mesure de tout autre paramètre.

CVJETANOVIC (118) vaccine des chimpanzés quotidiennement pendant quatre jours consécutifs à l'aide d'une souche avirulente vivante de Salmonella typhi, ces animaux sont protégés contre une dose massive d'une souche pathogène vivante administrée dix jours plus tard.

Peu de résultats ont été publiés jusqu'à présent en ce qui concerne la vaccination humaine. Des essais pratiqués par HORNICK (191,192) sur des adultes volontaires qui avaient avalé pendant trois jours consécutifs des tablettes de vaccin tué monovalent (souche Ty 2v), avant d'être éprouvés 2 à 6 mois plus tard par 10^5 bactéries pathogènes vivantes, n'ont pas permis de mettre en évidence une protection. En revanche une réduction notable du taux d'infection a pu être observée par DUPONT (132) en doublant la posologie du vaccin. De leur côté, GRAHNEIS (173) et KAROLCEK (210) ont obtenu également une protection significative en utilisant un vaccin associé typhique-paratyphique inactivé.

Il semble que les vaccins vivants soient cependant plus efficaces que les vaccins tués. Les premiers résultats favorables obtenus par HORNICK (190) grâce à l'utilisation d'une souche vivante streptomycino dépendante ont été en effet confirmés ultérieurement par MEL (264).

2) Shigelloses :

La voie orale s'est montrée plus efficace que les autres voies pour la vaccination contre les shigelloses. Avec des vaccins tués monovalents ou combinés, RAETTIG et coll. (330) ont obtenu un abaissement considérable de la mortalité des souris ayant reçu une dose d'épreuve de bactéries pathogènes par voie intrapéritonéale. Cependant, en effectuant l'épreuve par voie cérébrale, après vaccination à l'aide de vaccins tués, MEL et coll. (260) n'ont observé une protection satisfaisante qu'avec deux vaccins sur les quatorze essayés. Selon ces mêmes auteurs, aucun vaccin vivant, ou tué, administré

par voie intrapéritonéale ne protège contre une infection intestinale. Mais les vaccins vivants donnés par voie orale confèrent une immunité dont le degré est proportionnel à la dose vaccinale utilisée. Il semble que le contact de la bactérie avec la muqueuse intestinale joue un grand rôle dans le cas particulier des shigelloses. Selon LABREC (232), les souches virulentes peuvent traverser cette muqueuse alors que les souches avirulentes en sont incapables.

Les essais pratiqués sur le singe par FORMAL (151,152,153,154) ont montré qu'il était possible de protéger efficacement l'animal contre une infection expérimentale, à condition d'administrer cinq doses consécutives d'une souche atténuée vivante de Shigella flexneri, mais qu'une seule dose de souche hybride de Shigella flexneri et E.coli suffisait pour obtenir le même résultat. L'immunité observée présente une certaine spécificité et s'accompagne d'une élévation du taux des anticorps sériques sans qu'il y ait de modification de celui des coproanticorps.

L'efficacité du vaccin vivant a pu être confirmée grâce aux nombreux essais pratiqués au cours de ces dix dernières années, chez l'homme par MEL (261,262,263,265), DUPONT (130,133), LEVINE (245) et TERZIN (396); et chez l'animal par DENCHEV (122), MEL (260) et KETYI (215). Il s'agit, chez l'homme, à la fois de campagnes de vaccination en zone d'endemicité et d'épreuves sur volontaires effectuées, soit avec des souches streptomycino dépendantes, soit avec des souches hybrides de shigelles (130). Les résultats obtenus montrent qu'en administrant quatre ou cinq doses de vaccin à intervalles de deux à quatre jours, on peut atteindre une protection allant de 85 à 100 %.

L'immunité s'accompagne d'une augmentation significative du taux de coproanticorps spécifiques (TERZIN (396)). Il convient de noter, cependant, que d'autres vaccins atténués essayés par RUBSTOV (362) n'ont pas fait preuve de la même efficacité. Il est intéressant de souligner également qu'un vaccin antidysentérique vivant administré par os à des enfants par ISTRATI (198) a permis de guérir un pourcentage élevé de sujets atteints de dysenterie bacillaire. Les mêmes résultats encourageants ont été obtenus par GRAHNEIS (174) à l'aide de vaccin tué.

3) Choléra :

Le fait que l'infection cholérique naturelle soit limitée à l'espèce humaine rend difficile l'étude de l'efficacité des vaccins buccaux; cependant, des modèles expérimentaux valables ont été réalisés sur l'anse ligaturée de certains animaux tels que la souris par FINKELSTEIN (147), le lapin (146) ou le chien. Ils ont permis d'établir que l'apparition du choléra est liée à la multiplication du vibrion dans la lu-

mière intestinale et à la production par ce dernier d'une entérotoxine. Diverses observations permettent d'autre part de penser qu'il existe, pour le choléra, une certaine corrélation entre la résistance à la maladie et le taux d'anticorps soit vibriocides soit antitoxiques (46).

BHATTACHARYA et coll.(47) ont montré que l'introduction d'une souche avirulente de Vibrio el Tor dans l'anse intestinale isolée du lapin adulte, entraîne à ce niveau une inhibition du développement d'une souche pathogène et une production d'anticorps antitoxiques. Utilisant les mêmes techniques HOWARD (193) a obtenu des résultats identiques avec des mutants non choléragènes de Vibrio cholerae. Travaillant également sur le lapin, AGARWAL et GANGULY (2) ont mis en évidence une production massive de copro-anticorps après administration orale d'un lysat de forme L de cette espèce.

Des essais effectués sur des volontaires (123) ont permis de constater que des individus qui avaient subi une infection cholérique, demeurent protégés contre une souche pathogène douze mois plus tard. Ceci constitue un argument sérieux en faveur des vaccins vivants. La possibilité d'utiliser des antigènes purifiés n'est pas exclue, puisqu'une toxine détoxifiée utilisée par FINKELSTEIN et HOLLINGWORTH (146,147,148) a conféré une protection satisfaisante chez l'animal. Une protéine extraite de la paroi ectoplasmique et qui serait commune à plusieurs souches a montré également un pouvoir protecteur chez le souriceau (NEOH et ROWLEY (282)).

4) Entérites à Escherichia coli :

Certains sérotypes d'E.coli peuvent être à l'origine de diarrhées graves, voire mortelles chez le nourrisson. Les souches entéropathogènes pour l'homme ne donnent pas les mêmes symptômes chez les animaux sensibles; mais on admet aujourd'hui que les porcelets infectés par leurs E.coli pathogènes naturels constituent un modèle expérimental valable pour étudier la pathogénie de la diarrhée humaine à E.coli.

D'autre part, le test de protection de la souris contre une dose léthale de souches virulentes peut être considéré comme significatif pour l'étude de l'efficacité des vaccins (CAMERON (87)).

De même que pour le choléra, deux facteurs sont à l'origine de la maladie : la prolifération bactérienne et la production d'une toxine.

Il est possible selon SMITH (375,376) d'obtenir une protection contre la diarrhée en administrant un antisérum par voie buccale, à condition que celui-ci soit spécifique de la souche infectante. Les anticorps dirigés contre l'entérotoxine ont également un

effet protecteur d'après KOHLER (222). Des essais effectués sur la souris par RAETTIG (334;335,336) ont montré que les bactéries pathogènes tuées, administrées sous forme de vaccins monovalents ou associés, confèrent une protection satisfaisante. L'immunité apparaît déjà vers la vingt-quatrième heure, elle atteint son maximum vers le dixième jour et se prolonge au-delà de trois mois (338). Cependant, KENNY (214) utilisant le même animal, aboutit à des conclusions opposées.

Un extrait antigénique obtenu en traitant des souches pathogènes par le désoxy-cholate de sodium (OCKLITZ (287), MOCHMAN (272), TRIAU (412)) de même qu'un antigène isolé par RAUSS (341,342) suivant la méthode de BOIVIN ont également fait preuve d'efficacité chez cet animal. Partant de ces résultats, des essais de grande envergure ont été entrepris sur des adultes par DUPONT (131) et sur des enfants en bas âge par GIRARD (167), RAUSS (342) et KUBINYI (230). Aucune épidémie n'a permis de vérifier ultérieurement l'efficacité de cette vaccination, mais on a pu observer que celle-ci provoquait soit une augmentation des immunoglobulines intestinales, selon GIRARD (166,167) et PANERO (300), soit une élévation du taux des anticorps sériques selon RAUSS (341). Il est intéressant de souligner qu'aucun de ces vaccins n'a entraîné de signes d'intolérance chez les sujets vaccinés.

CONCLUSION

La vaccination par voie orale contre les infections intestinales franchit peu à peu le stade expérimental pour entrer dans le domaine de l'application pratique. Plus commode à réaliser chez les humains que la vaccination parentérale, elle est aussi mieux supportée et peut être considérée dès à présent comme étant plus efficace que cette dernière. Elle présente, d'autre part, l'avantage de conférer une immunité très précoce.

Mais cette méthode de prophylaxie pose encore de nombreux problèmes notamment celui de la recherche de mutants ou de souches hybrides présentant des propriétés immunisantes convenables, tout en étant inoffensives et d'une durée de conservation satisfaisante. La possibilité d'utiliser des antigènes chimiquement définis et stables (lipopolysaccharides, protéines ou entérotoxines) n'a pas été suffisamment explorée. Enfin, bien des points restent encore à préciser, concernant les mécanismes immunitaires mis en jeu au niveau de la muqueuse intestinale.

CHAPITRE II

L'IMMUNITE INTESTINALE
IMPORTANCE DES IMMUNOGLOBULINES SECRETOIRES

Les entérobactéries pathogènes ont pour caractéristique commune de pénétrer dans l'organisme par la voie digestive. Il est donc logique de penser que les premiers obstacles à leur invasion et à leur prolifération vont être constitués par les mécanismes immunitaires agissant soit dans la lumière intestinale soit dans les tissus périphériques voisins. La connaissance de ces moyens de défense locaux a progressé considérablement au cours de ces dernières années grâce à la réalisation sur animaux, de modèles expérimentaux permettant l'étude de la pathogénie des infections à entérobactéries.

Nous ne parlerons pas ici des changements pathologiques qui peuvent être induits dans les tissus de l'hôte par ces bactéries. Ces observations effectuées dans le cas des affections typhoïdiques, des shigelloses, du choléra et des entérites à E.coli ont été résumées par un groupe d'Experts de l'O.M.S. (296).

En revanche, nous examinerons les principaux paramètres intervenant dans l'immunité intestinale en insistant plus particulièrement sur le rôle des immunoglobulines sécrétoires puisqu'il s'agit d'un des objets essentiels de nos recherches personnelles. Toutefois, nous pensons qu'avant d'étudier la réaction d'un organisme à l'administration d'un antigène par voie orale il importe de connaître la destinée de cet antigène qui entre par la voie digestive.

I - DESTINEE DE L'ANTIGENE ABSORBE :

Un antigène absorbé par voie buccale devra résister à l'acidité gastrique avant d'atteindre la muqueuse intestinale. Il lui faudra ensuite traverser cette dernière et, soit rester sur place pour induire une réponse immunitaire du type local, soit gagner le système lymphatique puis le système sanguin pour déclencher une réponse immunitaire générale (31, 32, 37).

La pénétration de l'antigène à travers la muqueuse du tractus digestif constitue la clé de voûte de l'immunisation par voie orale. On a admis pendant longtemps que seules les molécules solubles étaient capables de franchir cette barrière. En fait HERBST (Cf 335) avait déjà montré en 1844 que les cellules de levure pouvaient traverser la paroi intestinale chez le chien. Ce phénomène après avoir été confirmé par HIRSH (Cf 335) en 1906 a été étudié d'une manière systématique depuis 1964 par VOLKEIMER (433,434) ainsi que par de nombreux auteurs (51,145,226,395).

Il ressort de ces travaux que des particules de taille importante (allant jusqu'à 150 μ) peuvent passer entre les cellules épithéliales de l'intestin et rejoindre la circulation lymphatique. C'est ce que les auteurs appellent "persorption". Plus récemment RAETTIG (335) a étudié la persorption de particules virales administrées à la souris par os tandis que HOFFMAN a observé le même phénomène en utilisant le phage T3.

Les résultats obtenus par MEVES, VECKER et RAETTIG (335) dans le cas des bactéries méritent une attention particulière, dans la mesure où ils démontrent que les corps bactériens de S.typhimurium inactivés et marqués par des isotopes radioactifs, franchissent rapidement la paroi intestinale de la souris et passent dans la circulation générale avant d'être éliminés au niveau de la muqueuse des voies aériennes supérieures. D'après FUNK (Cf 335) des antigènes encore plus volumineux tels que Candida albicans subissent la persorption suivant une cinétique tout aussi rapide.

La barrière intestinale ne constitue donc pas un obstacle infranchissable pour les antigènes macromoléculaires ou particulaires. Toutefois, la réponse immunitaire varie suivant la taille des antigènes. CORNELL (102) a, en effet, montré que plus la molécule d'antigène est petite, plus son pouvoir immunogène est grand. C'est le cas par exemple pour la peroxydase du raifort dont le poids moléculaire est de 40.000 daltons. Que la stimulation antigénique soit locale ou générale elle entraîne la mise en oeuvre de moyens de défense qui peuvent être non spécifiques ou spécifiques, se traduisant dans le second cas par la synthèse d'IgA selon HEREMANS (187), CRABBE (103, 104, 107, 109, 111), OGRA (292, 293, 294), REED (344), FUBARA (159), LASCELLES (234), DOLEZEL (125, 126) et KORENBLAT (225).

II - MECANISMES DE L'IMMUNITE INTESTINALE

1) Les moyens de défense non spécifiques :

Diverses théories ont déjà été proposées pour tenter d'expliquer la résistance non spécifique aux infections. Quelques unes d'entre elles attribuent un rôle important à des facteurs génétiques propres à l'hôte. Il est bien connu, par exemple, que les antigènes de certaines bactéries et les antigènes des groupes sanguins peuvent présenter des déterminants communs. Mais l'âge, l'alimentation et l'état physiologique des individus ont été également évoqués comme étant à l'origine des différences de sensibilité aux agents infectieux. Ces explications n'ont eu jusqu'à présent qu'une portée limitée.

C'est pourquoi nous ne les développerons pas ici. En revanche nous examinerons les principaux facteurs dont le rôle au niveau du tube digestif a pu être démontré.

Le premier obstacle à la pénétration des entérobactéries est constitué par l'acidité gastrique. Celles-ci ne présentent pas toutes la même résistance aux valeurs faibles de pH. Vibrio cholerae par exemple est sensible aux valeurs inférieures à 5 tandis que S.typhi résiste à un pH égal à 3.

Les espèces du genre Shigella paraissent survivre à l'acidité de l'estomac humain (296).

Une fois arrivés dans l'intestin grêle les germes vont rencontrer des conditions plus favorables à leur multiplication. Toutefois, il existe encore à ce niveau des substances antibactériennes non spécifiques. On peut citer notamment le mucus de la paroi intestinale, le lysosyme et des protéines plus ou moins complexes que l'on trouve dans le suc intestinal comme la lactoferrine et la β_2 glycoprotéine.

Ces molécules sont souvent actives en association avec d'autres constituants. C'est le cas en particulier pour le lysozyme dont GIRARD (166) et ADINOLFI (1) ont constaté le rôle bactéricide. GIRARD a notamment montré sur le liquide duodénal que cette enzyme facilitait la phagocytose des bactéries, aussi bien en présence d'IgA que d'IgM. Selon PETRAKIS (305) le lysozyme, en effet, n'est pas actif par lui-même mais le devient en présence d'immunoglobulines spécifiques. CARRAZ (89) a d'ailleurs mis en évidence un accroissement parallèle des taux de lysozyme et d'IgA au cours de l'immunité.

La β_2 glycoprotéine agirait comme proactivateur dans le processus d'activation du composant C'3 du complément. Des expériences récentes ont montré que ce dernier pouvait être également activé par le complexe IgA-antigène, entraînant ainsi pour l'IgA un rôle d'opsonine active envers les bactéries à Gram négatif (296).

Enfin, au niveau du gros intestin la flore intestinale normale joue un rôle important. Elle synthétise en effet des acides gras volatils qui s'opposent au développement des bactéries Gram négatif.

2) Les moyens de défense spécifiques :

L'intestin de l'homme et des animaux renferme un très grand nombre de cellules lymphoïdes. Celles-ci forment un ensemble immunitaire assez vaste allant du système ganglionnaire mésentérique aux plaques de Peyer, en passant par les amas de follicules de la sous muqueuse et les plasmocytes de la lamina propria.

En arrivant sur la muqueuse intestinale l'antigène est capté par le macrophage. Ce dernier bien que ne jouant aucun rôle direct dans la synthèse des anticorps représente une étape importante dans la transmission de l'information antigénique aux cellules assurant la synthèse des immunoglobulines.

Le rôle important du macrophage a été démontré par ARGYRIS (14) et PIERCE (307). En effet l'immaturité immunologique du jeune est liée non pas à l'absence de cellules immunocompétentes, mais bien à celle de macrophages, puisque la transplantation de macrophages adultes chez le nouveau-né, produit cette réponse immunitaire.

Le macrophage après avoir capté l'antigène, va transmettre son information antigénique spécifique aux lymphocytes grâce à certaines fractions de RNA. Cette capacité d'induire la formation d'anticorps spécifiques est en effet supprimée par la ribonucléase. On ne sait cependant pas exactement si c'est le RNA du macrophage qui est directement responsable de la transmission de l'information ou s'il modifie simplement l'antigène pour le rendre plus efficace dans l'induction de la synthèse des anticorps.

Les cellules immunocompétentes recevant l'information vont alors synthétiser les immunoglobulines spécifiques (208,397,436). Examinées au microscope électronique, ces cellules présentent un réticulum endoplasmique rugueux, signe d'une synthèse protéique intense. Ceci a été confirmé chez les plasmocytes par une coloration basophile du cytoplasme (RNA du réticulum endoplasmique et ribosomique) et par la présence de granulations pyroninophiles.

Ces phénomènes immunitaires peuvent se produire localement, mais aussi s'étendre à l'organisme tout entier soit en raison du passage direct de l'antigène dans la circulation générale soit à cause de la diffusion des immunocytes intestinaux activés vers les organes lymphoïdes périphériques. En effet, dans le ganglion mésentérique et dans la rate, on remarque une diminution du nombre de plasmocytes à IgA synthétisant les anticorps spécifiques de l'antigène administré oralement.

Ce sont les plasmocytes de la lamina propria qui sont à l'origine de la production des immunoglobulines des sécrétions intestinales comme l'ont montré HEREMANS (185,186) et BAZIN (30,33,34,35,36).

Après avoir mentionné succinctement les différentes classes d'immunoglobulines humaines, nous nous attacherons à étudier plus particulièrement les IgAS (immunoglobulines A sécrétoires) qui représentent la classe d'immunoglobulines intestinales dont le taux est le plus élevé chez l'homme.

III - LES IMMUNOGLOBULINES SECRETOIRES

1) Généralités et structure des différentes immunoglobulines :

L'activité anticorps est liée à des molécules de nature glycoprotéique de mobilité électrophorétique variable. On les répartit en cinq groupes différents en fonction de critères physicochimiques et immunologiques.

Chez l'homme, les IgM, IgA et IgG sont les plus importantes, les IgD et IgE étant deux classes mineures, bien qu'actuellement l'IgE prenne une place prépondérante puisqu'elle est en relation directe avec les phénomènes d'allergie (206,285). Chez la souris, BAZIN (29) et KALPAKTSOGLU (209) distinguent cinq catégories d'immunoglobulines, les IgA, IgM, IgG, IgG_{2a} et IgG_{2b}, tandis que FAHEY (138) en décrit quatre essentielles (IgA, IgG, IgG₂ et IgM). Chez le poulet on a longtemps cru à l'existence d'une IgY (242,243) mais LEBACQ (239) et GERRIE (165) ont prouvé aujourd'hui qu'il s'agissait d'un homologue de l'IgA humaine.

La configuration des immunoglobulines a été étudiée par PAULING. D'après cet auteur, la chaîne polypeptidique présente une structure hélicoïdale de type α . Cette hélice α se replie sur elle-même pour conférer à la molécule sa forme globulaire. A ces chaînes polypeptidiques est associé un copule glucidique uni soit par liaison amide, soit par liaison ester. Les IgG sont les moins riches en glucides 3,1 p.100 alors que les IgM en contiennent 10 p.100 et les IgA 11 p.100.

Les immunoglobulines ont la forme d'ellipsoïdes. Les IgA et IgG sont très allongées, les IgM sont nettement plus grosses et plus aplaties. Ces protéines s'entourent d'une couche d'eau, en moyenne deux molécules d'eau par résidu d'acide aminé.

Classes	Poids moléculaire	Constante de sédimentation	Taux plasmatique en µg/ml	Caractéristiques
IgM	950.000	19 S	1.250	La première synthétisée
IgA	165.000	7 S	2,8	constituant mineur du sérum
IgAS	390.000	11 S	0,4	constituant majeur des sécrétions
IgG	165.000	7 S	12.500	constituant majeur du sérum
IgD	190.000	7 S	50	- cutanées - sécrétions duodénales
IgE	200.000	8 S	0,3	Allergies

TABEAU V - Principales immunoglobulines humaines.

L'hydrolyse enzymatique, papaïnique ou pepsinique, pratiquée par BROWN (75), PORTER (32), WILSON (450,451,452,453), SHUSTER (373) et STEINBUCH (386) a permis de mettre en évidence l'existence de plusieurs fragments chez les immunoglobulines. SATISH (365) met en évidence une enzyme d'origine microbienne au niveau gastro-intestinale, celle-ci a la propriété de ne libérer que le fragment Fc intact.

Ainsi, sous l'action de la papaïne, les immunoglobulines se décomposent en trois fragments :

- deux Fab (antigen binding, ou fragment S, slow),
- un Fc (ou fragment F, fast) pouvant se lier facilement au complément et qui cristallise aisément alors que ni Fab ni la molécule entière ne le peuvent.

L'action de la pepsine libère Fc et ne rompt pas les liaisons entre les deux fragments Fab.

Les immunoglobulines de myélome ont été largement utilisées pour étudier la structure. Ainsi, BERNIER (43) en 1965, a pu étudier celle de l'IgA mais il a fallu attendre 1968, 1969 pour obtenir, grâce aux travaux de FRANEK (156) sur les IgG, la première structure complète d'une immunoglobuline. C'est aussi à partir de protéines de myélome qu'EDELMAN est parvenu en 1969 à proposer la structure fine d'une IgG,

son poids moléculaire, la séquence et la nature des 1.320 amino acides qui la composent et sa configuration générale en quatre chaînes : deux chaînes lourdes H ou α et deux chaînes légères L, sous forme λ ou κ , unies par des ponts disulfures. WOLFENSTEIN (455) a confirmé par hydrolyse enzymatique, l'existence de ces ponts disulfures chez l'IgA.

2) Les immunoglobulines de sécrétion :

Les immunoglobulines sécrétoires, nous l'avons vu, sont le résultat de la réponse spécifique de toute muqueuse à l'arrivée d'un antigène.

Ce sont des glycoprotéines douées de propriétés anticorps. Les sécrétions intestinales des animaux contiennent des immunoglobulines de classe IgG, IgM et IgA, celles de l'homme peuvent contenir en outre des IgD (228).

Les deux classes les plus importantes sont les IgGs et les IgAs.

Les IgGs ont été mises en évidence principalement au niveau des muqueuses respiratoires depuis 1966 par ROSSEN (359) et STROBER (389). En 1973 WALDMAN (442) constate l'importance des taux d'IgG dans les lavages pulmonaires effectués chez l'homme après vaccination par aérosol. Les résultats obtenus par FONTANGES et FOURNIER (150,155) laissent supposer également une synthèse prépondérante d'IgGs au niveau des poumons. EDDIE (134) constate que la muqueuse de l'intestin grêle de lapin mise en contact avec des Salmonella typhimurium vivantes synthétise des anticorps anti O représentés à la fois par des IgG et des IgA. SULLIVAN (391) montre la présence d'IgG sécrétoires dans le colostrum et la salive de la vache et du mouton. Cependant, ce sont bien les IgAs qui représentent la majorité des immunoglobulines de sécrétion au niveau intestinal, c'est pourquoi nous étudierons plus particulièrement cette classe d'immunoglobulines.

IV - STRUCTURE DES IgAs

En 1958, GUGLER et coll. (cf. 406) ont été les premiers à mettre en évidence par immunoélectrophorèse la présence d'IgA dans les sécrétions externes colostrales. HEREMANS en 1959, a défini la classe des IgA. Le travail de cet auteur est d'une importance capitale puisqu'il est démontré de nos jours que cette classe d'immunoglobulines prédomine dans les nombreuses sécrétions externes, que celles-ci soient salivaires (38,195,196), mammaires (38,277,318), rectales (162), séminales (414),

lacrymales (248) ou intestinales (3,44,97,145,308,368,395,409,427,446). En 1961 HANSON (179) rapporte que l'IgA, constituant mineur du plasma sanguin, prédomine dans le colostrum humain, il découvre en outre dans l'IgA colostrale des déterminants antigéniques absents de l'IgA sérique.

L'immunoglobuline la plus importante au niveau des sécrétions externes a un coefficient de sédimentation de 11 S et un poids moléculaire de 390.000, c'est l'IgA sécrétoire ou IgAs.

L'IgAs a été étudiée chez l'homme par TOURVILLE (411), BRANDTZAEG (69), BIENENSTOCK (49), TOMASI (407,408), VAERMAN (420,426), CRABBE (108), TOMANA (402), KOBASHI (220,221) et chez de nombreuses espèces animales :

- chez la souris par FAHEY (138,140), ASOFSKY (16), NASH (281), BAZIN (34), CRABBE (111)
- chez le rat par BISTANY (53), NASH (280),
- chez le lapin par CEBRA (91), SMITH (377), O'DALY (289,290,291), GENCO (164),
LAWTON (236,237,238), ASOFSKY (15), SELL (370), CRANDALL (113),
- chez le chien par VAERMAN (416,417,418,421,422), ANDERSEN (9), REYNOLDS (348,349,
350,351), RICKS (354), MACH (253),
- chez le hamster par BIENENSTOCK (50), HAAKENSTAD (176),
- chez le hérisson par VAERMAN (424),
- chez les bovidés par PORTER (317,318,319,320), DUNCAN (129), BUTLER (85,86),
MACH (251,252,254,255),
- chez le mouton par HEIMER (182), MACH (253), LASCELLES (234), LEE (241), CURTAIN
(116), WATSON (447) et SULLIVAN (391),
- chez le porc par BOURNE (56,57,58), ALLEN (7), ATKINS (18), PORTER (312,313,314,
315,316,321,322) et KNOP (219),
- chez le cheval par GENCO (163), VAERMAN (423), PAHUD (299) et ROUSE (361),
- chez le cobaye par COE (98),
- et enfin chez le poulet par BIENENSTOCK (52), WATANABE (445), LESLIE (242,243),
LEBACQ (240) et KONO (223).

Ces différentes études ont permis de mieux connaître les propriétés structurales de l'IgAs.

A - Propriétés comparées des IgA sécrétoires et des IgA sériques

1) Propriétés structurales :

On trouve dans le sérum une IgA de PM = 165.000 et de constante de sédimentation 7 S, pouvant exister sous forme monomérique, dimérique (60 à 80 p.100 chez le chien) ou polymérique. Cette IgA 7 S est constituée de deux chaînes polypeptidiques légères dites light ou L, sous forme lambda (λ) ou kappa (κ), reliées par des ponts disulfures à deux chaînes polypeptidiques lourdes dites heavy ou H, ou encore chaîne α .

Si l'IgA sécrétoire, IgAs, peut se trouver exceptionnellement en très faible quantité dans le sérum, on la rencontre habituellement dans les liquides baignant les muqueuses sécrétoires, comme nous l'avons vu précédemment. Bien que BRANDTZAEG (72) ait démontré qu'elle pouvait exister dans la salive ou le colon sous forme de monomère l'IgAs existe le plus souvent sous forme de dimère de PM 390.000 et de constante de sédimentation 11 S. Elle est constituée de deux molécules 7 S unies par des ponts disulfures ou des liaisons non covalentes à une glycoprotéine de constante de sédimentation 4 S appelée secretory pièce (SP), T chain, T component, Transport pièce, ou secretory component (SC).

2) La pièce Secréttoire "SP" :

a) Structure de SP.

C'est une glycoprotéine qui différencie l'IgA sécrétoire de l'IgA sérique. On la trouve au taux de 209 mg/100 ml dans le colostrum humain et de 1 à 2 mg/100 ml dans la salive. On peut la rencontrer à l'état libre (66,220,279) ou associée à l'IgA. Son poids moléculaire varie selon la méthode de détermination, entre 35.000 et 70.000. Ainsi NEWCOMB (283) après réduction de l'IgAs par le dithioérythritol (D.T.E.) suivie d'alkylation par l'iodacétamide, obtient un composé de PM : 76.000. KOBASHI (220) travaillant également sur le colostrum humain, conclut à un PM de 75.000, alors qu'il ne trouve qu'une valeur de 40.000 en partant de lait humain (221). VAN MUNSTER l'isole à l'état libre à partir du lait humain (428,429) et lui attribue un PM de 90.000. En pratique, on considère de nos jours que son PM est voisin de 60.000.

Le même auteur (430) en a déterminé la composition en glucides et en acides aminés. Il trouve un taux élevé de fucose et remarque l'absence de méthionine et de N acétylgalactosamine.

b) Place de SP dans l'IgAs

Le mode de liaison de SP aux chaînes lourdes H varie en fonction de l'espèce dont provient l'IgAs. Ainsi NEWCOMB (283) montre l'existence de liaisons par ponts disulfures dans l'IgAs de colostrum humain alors que CEBRA (91) et LAWTON (237,238) pensent qu'ils s'agit de liaisons non covalentes chez le lapin.

Plusieurs modèles structuraux ont alors été proposés; selon CEBRA l'IgAs est formée de deux monomères 7 S et de deux SP; pour HONG (189) elle est constituée, chez l'homme, de trois monomères 7 S et d'un SP; tandis que TOMASI et BIENENSTOCK (406) admettent à cette époque que cette IgAs contient un monomère 7 S et plusieurs unités SP. Plus tard, MACH (253,254,255), NEWCOMB (283), TOMASI (410) et HURLIMAN (195) optent tous pour une structure dimérique, c'est-à-dire deux molécules d'IgA 7S identiques en tous points à l'IgA sérique liées à SP par des ponts disulfures (excepté une faible fraction de 20 p.100). C'est cette structure qui est admise actuellement, du moins en ce qui concerne l'IgAs d'origine humaine.

c) Propriétés de SP

Elles sont au nombre de trois, la sélectivité d'association, la présence d'un déterminant antigénique particulier et enfin le rôle de protection vis-à-vis de l'IgA et éventuellement de "Transporteur".

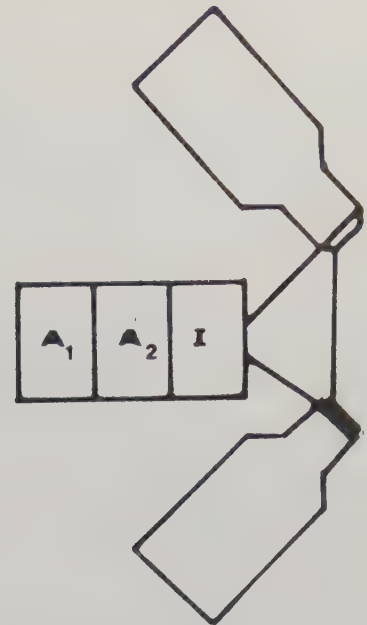
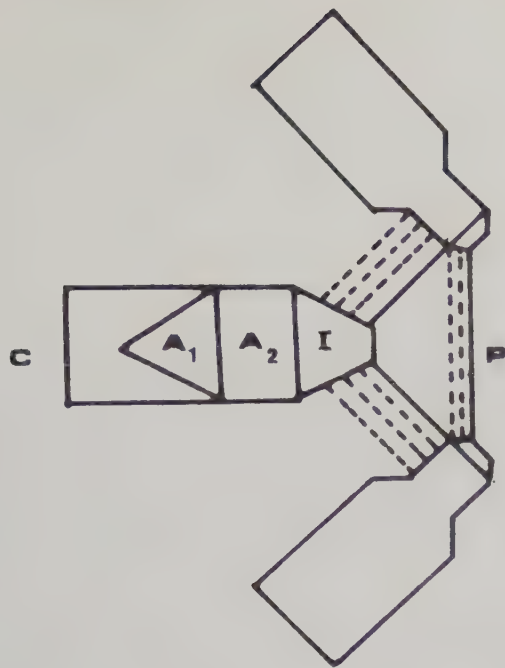
O'DALY (289), RADL (324) et BRANDTZAEG (67,68) ont montré que l'association de SP aux dimères se faisait de façon sélective, les monomères ne donnant pas de telles structures. Toutefois, MACH (254) a prouvé que SP libre d'origine humaine ou bovine, pouvait s'associer à des IgA myélomateuses de souris et à l'IgA sérique de neuf espèces de mammifères.

La pièce sécrétoire porte un déterminant antigénique distinct de celui des chaînes H et L (λ ou κ); c'est ce qui a permis à TOMASI (403) de l'identifier. En effet, un sérum anti-IgAs après avoir été saturé en IgA sérique continue à précipiter l'IgAs. Toutefois, lorsque la molécule de SP est liée aux dimères, l'antigénicité exprimée est faible. Or, en dénaturant progressivement la molécule d'IgAs on parvient à renforcer le pouvoir antigénique de SP. En effet, pour BRANDTZAEG (62,63,65) la glycoprotéine SP a une antigénicité complexe. En plus de deux groupements accessibles A₁ et A₂, elle contient un déterminant inaccessible I mis en évidence dans SP libre. La Figure 1 donne une représentation schématique de la mise en évidence des sites antigéniques de SP sous l'effet de la dénaturation.

Native

Dénaturée

31



Réduite

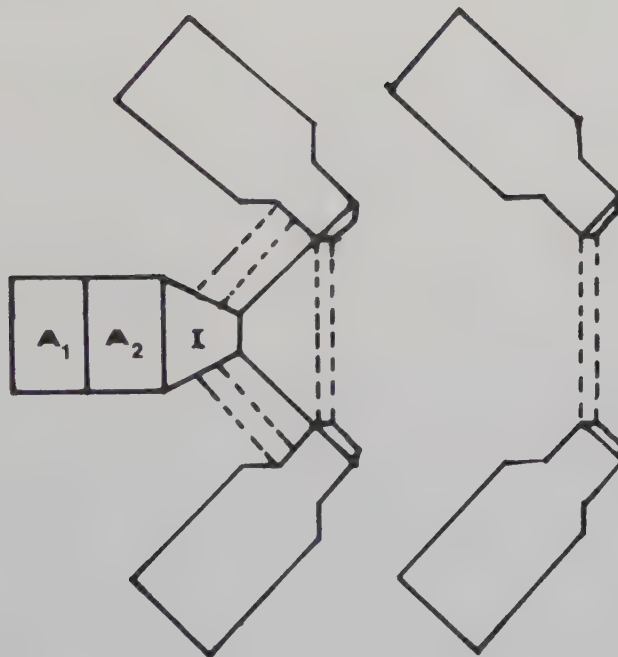


FIGURE 1 - Représentation schématique des effets de la dénaturation et de la réduction. Alkylation sur la structure et l'antigénicité de l'IgAs humaine selon BRANDTZAEG.

——— Liaisons disulfures

----- Liaisons non covalentes

A₁ - A₂ = Déterminants accessibles

I = Déterminants inaccessibles

C = Configuration de SP liée

P = Spécificité des IgA dimériques.

VAN MUNSTER (428) montre qu'il existe des différences de propriétés antigéniques entre la forme liée et la forme libre de SP. Ces différences résultent probablement d'une modification de la structure quaternaire lorsque l'on passe de la forme libre à la forme liée.

En dehors de sa qualité de support d'un déterminant antigénique particulier, SP semble jouer un rôle de protecteur vis-à-vis de la molécule d'IgA. En effet, SHUSTER (373) et TOMASI (407) ayant soumis l'IgAs à l'hydrolyse pepsique, trypsique et papaïnique constatent que l'IgAs résiste mieux à l'attaque enzymatique que l'IgA sérique. Selon REYNOLDS (348,351) ceci explique l'existence des coproanticorps.

Enfin, pour certains auteurs SP servirait de "Transporteur" permettant à l'IgAs de traverser les muqueuses pour rejoindre la lumière intestinale. MELCHERS (266) en particulier fait un rapprochement avec le mode de transport des thyroglobulines. Mais ceci est loin d'être démontré, comme nous le verrons ultérieurement.

En résumé, la pièce sécrétoire SP est une glycoprotéine douée de propriétés particulières, qui peut se trouver dans le sérum et surtout au niveau des muqueuses sécrétoires, soit à l'état libre, soit associée aux IgA dimériques sous forme d'IgAs.

3) "La pièce J"

En 1970, HALPERN (177,178) travaillant sur l'IgAs du lapin et de l'homme, met en évidence un nouveau constituant dans les IgAs polymérisées : la "pièce J" (joining). Cette glycoprotéine particulière de grande mobilité électrophorétique a un poids moléculaire de 24.000. Cependant, pour SCHROHENLOHER (369) qui la purifie en 1973, son PM ne serait que de 15.600 ± 200 . En 1974, YOON SEKANG (460) isole la pièce J des immunoglobulines humaines et conclut qu'elle est formée de deux sous-unités, l'une de PM voisin de 13.000 à 17.000, l'autre de PM compris entre 6.000 et 11.500. La même année, RICARDO (352) qui la purifie à partir de l'IgM humaine lui attribue un PM de 29.000.

Pour MORISSON (274) la pièce J est caractéristique de toutes les immunoglobulines polymérisées. On la trouve, par exemple, dans l'IgAs, dans la forme polymère de l'IgA sérique et dans l'IgM (352). Il y aurait une pièce J par polymère. On en a déduit qu'elle unirait les sous-unités entre elles et contribuerait ainsi au maintien de la structure quaternaire des immunoglobulines, cette fonction résultant, selon MESTECKY (267) de la présence de cystéine.

VAN MUNSTER (428) montre qu'il existe des différences de propriétés antigéniques entre la forme liée et la forme libre de SP. Ces différences résultent probablement d'une modification de la structure quaternaire lorsque l'on passe de la forme libre à la forme liée.

En dehors de sa qualité de support d'un déterminant antigénique particulier, SP semble jouer un rôle de protecteur vis-à-vis de la molécule d'IgA. En effet, SHUSTER (373) et TOMASI (407) ayant soumis l'IgAs à l'hydrolyse pepsique, trypsique et papaïnique constatent que l'IgAs résiste mieux à l'attaque enzymatique que l'IgA sérique. Selon REYNOLDS (348,351) ceci explique l'existence des coproanticorps.

Enfin, pour certains auteurs SP servirait de "Transporteur" permettant à l'IgAs de traverser les muqueuses pour rejoindre la lumière intestinale. MELCHERS (266) en particulier fait un rapprochement avec le mode de transport des thyroglobulines. Mais ceci est loin d'être démontré, comme nous le verrons ultérieurement.

En résumé, la pièce sécrétoire SP est une glycoprotéine douée de propriétés particulières, qui peut se trouver dans le sérum et surtout au niveau des muqueuses sécrétoires, soit à l'état libre, soit associée aux IgA dimériques sous forme d'IgAs.

3) "La pièce J"

En 1970, HALPERN (177,178) travaillant sur l'IgAs du lapin et de l'homme, met en évidence un nouveau constituant dans les IgAs polymérisées : la "pièce J" (joining). Cette glycoprotéine particulière de grande mobilité électrophorétique a un poids moléculaire de 24.000. Cependant, pour SCHROHENLOHER (369) qui la purifie en 1973, son PM ne serait que de 15.600 ± 200 . En 1974, YOON SEKANG (460) isole la pièce J des immunoglobulines humaines et conclut qu'elle est formée de deux sous-unités, l'une de PM voisin de 13.000 à 17.000, l'autre de PM compris entre 6.000 et 11.500. La même année, RICARDO (352) qui la purifie à partir de l'IgM humaine lui attribue un PM de 29.000.

Pour MORISSON (274) la pièce J est caractéristique de toutes les immunoglobulines polymérisées. On la trouve, par exemple, dans l'IgAs, dans la forme polymère de l'IgA sérique et dans l'IgM (352). Il y aurait une pièce J par polymère. On en a déduit qu'elle unirait les sous-unités entre elles et contribuerait ainsi au maintien de la structure quaternaire des immunoglobulines, cette fonction résultant, selon MESTECKY (267) de la présence de cystéine.

Par opposition à SP, la pièce J est liée par des ponts disulfures à la chaîne α de l'IgA (268,269,270) et à la chaîne μ de l'IgM. De plus, elle est antigéniquement différente de SP et des chaînes α et L.

Dans l'IgAs, la pièce J n'est accessible qu'après dégradation totale de la molécule d'immunoglobuline. Elle semble jouer un rôle dans l'incorporation de SP à la molécule d'IgA. En effet, TOMASI (410) incubant, in vitro, de l'IgA sérique 11 S en présence de SP, obtient une molécule d'IgAs dont la structure antigénique est semblable à celle de la molécule d'IgAs native; par contre l'IgA 7 S ne fixe pratiquement pas de SP.

La composition en glucides de la pièce J a été étudiée par NIEDERMEIER (284) à partir d'IgAs et d'IgA sérique humaine. Pour un total de 7,6 p.100 en glucides, il trouve une composition identique pour l'IgAs et l'IgA sérique, soit une molécule de fucose pour trois moles de mannose, deux molécules de galactose, trois à quatre molécules de glucosamines et une molécule d'acide sialique.

En résumé: la chaîne J est présente dans la forme polymérisée de l'IgAs mais aussi dans celle de l'IgA sérique et de l'IgM. Son rôle consiste à réunir plusieurs molécules d'immunoglobulines et, éventuellement, de permettre l'incorporation de SP à la molécule d'IgA. Sa composition chimique est invariable quelle que soit son origine.

B - Composition chimique de l'IgAs

L'étude de la composition de l'IgAs nécessite une hydrolyse enzymatique préalable (pepsine, papaïne ou trypsine) soit une rupture des ponts disulfures au moyen de substances réductrices telles que la guanidine ou l'urée.

TOMANA (402) a étudié la composition chimique de l'IgAs de colostrum humain. Il trouve 8,7 p.100 de glucides dont 0,7 p.100 de fucose, 2,6 p.100 de mannose, 1,6 p.100 de galactose, 2,5 p.100 de glucosamine, 0,2 p.100 de galactosamine et 1,1 p.100 d'acide sialique.

La teneur en glucides des différents constituants de la molécule d'IgAs est de 63 p.100 pour les chaînes H, 2,5 p.100 pour les chaînes L, 28 p.100 pour SP et 6,5 p.100 pour la chaîne J. La répartition des glucides et leurs taux sont semblables dans les différents types de chaînes polypeptidiques, excepté pour la galactosamine qui a été trouvée dans les chaînes H et le fucose dont la concentration est supérieure dans SP. Les acides aminés sont tous de la série L.

C - Ultrastructure et représentation schématique de l'IgAs

La microscopie électronique a permis de préciser la structure de l'IgAs. MUNN (276) et DOURMASHKIN (128) étudiant l'IgA dimérique sérique de myélome, observent une forme en Y, ou plus exactement 2 Y opposés par leur extrémité inférieure. Il s'agit d'une structure souple qui correspond à la liaison de deux molécules d'IgA au niveau de la région Fc. Les branches du Y correspondent au Fab. (figure 2).

Par contre, BLOTH et SVEHAG (54,55,392) pensent que l'IgAs, qui peut éventuellement prendre la forme précédente, se présente plutôt sous une forme compacte en Y simple, résultant de la superposition des deux monomères, liés entre eux par la pièce sécrétoire.

A partir de ces données on peut attribuer à la molécule d'IgAs la représentation schématique donnée en figure 3.

Les phénomènes immunitaires au niveau des muqueuses ont intéressé de nombreux auteurs dont BIENENSTOCK (51), PERNIS (302), SUAU (390) et JOHNSON (207) dans la mesure où ils constituent une réaction locale de défense de l'organisme contre les agents infectieux. La synthèse des IgAs y occupe une place particulièrement importante.

V - SYNTHESE DES IgAs

1) Existence d'un système sécrétoire local

Alors que l'IgA est un constituant mineur du sérum, l'IgAs est l'immunoglobuline prédominante des sécrétions externes. Le rapport $\frac{\text{IgA}}{\text{IgG}}$ est en effet égal à 5/1 ce qui suppose une synthèse locale des IgA au niveau des muqueuses. Il est bien connu que le tissu lymphoïde de l'organisme est le siège de la synthèse des immunoglobulines (143); c'est le cas en particulier pour les ganglions, la moelle osseuse et la rate.

L'examen de ces organes lymphoïdes par immunofluorescence a permis à TOMASI (406) d'y mettre en évidence de trois à six cellules productrices d'IgG pour une IgA. Or on sait que l'IgA est synthétisée à la même vitesse que l'IgG mais catabolisée plus rapidement que cette dernière. On peut en déduire que les cellules productrices d'IgA ont une capacité de synthèse supérieure à celle des IgG ou qu'il

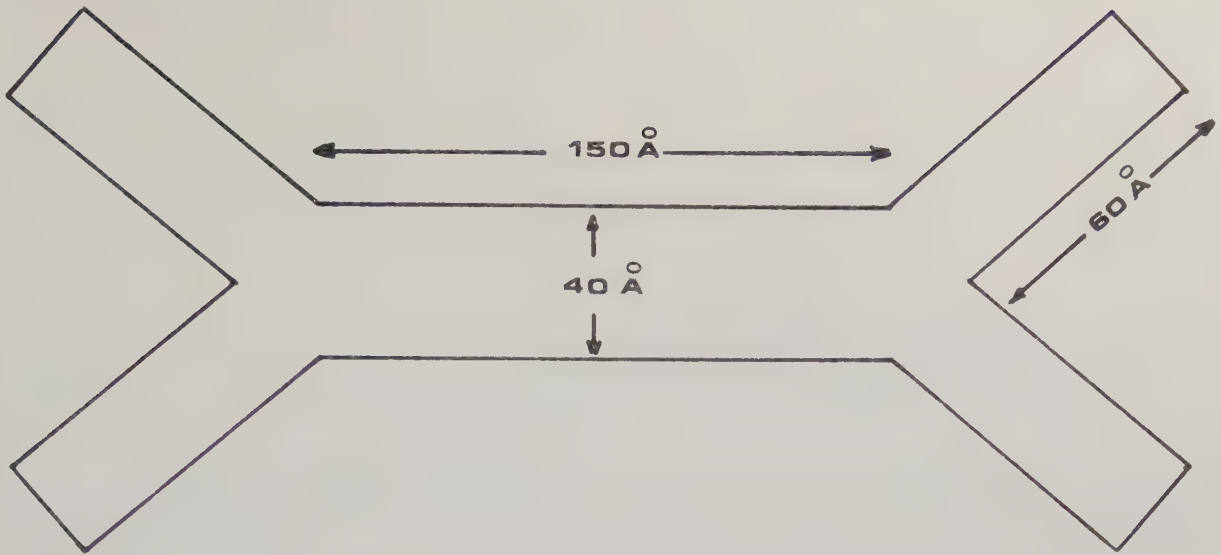


Figure 2 : Structure de l'IgA dimérique selon MUNN.

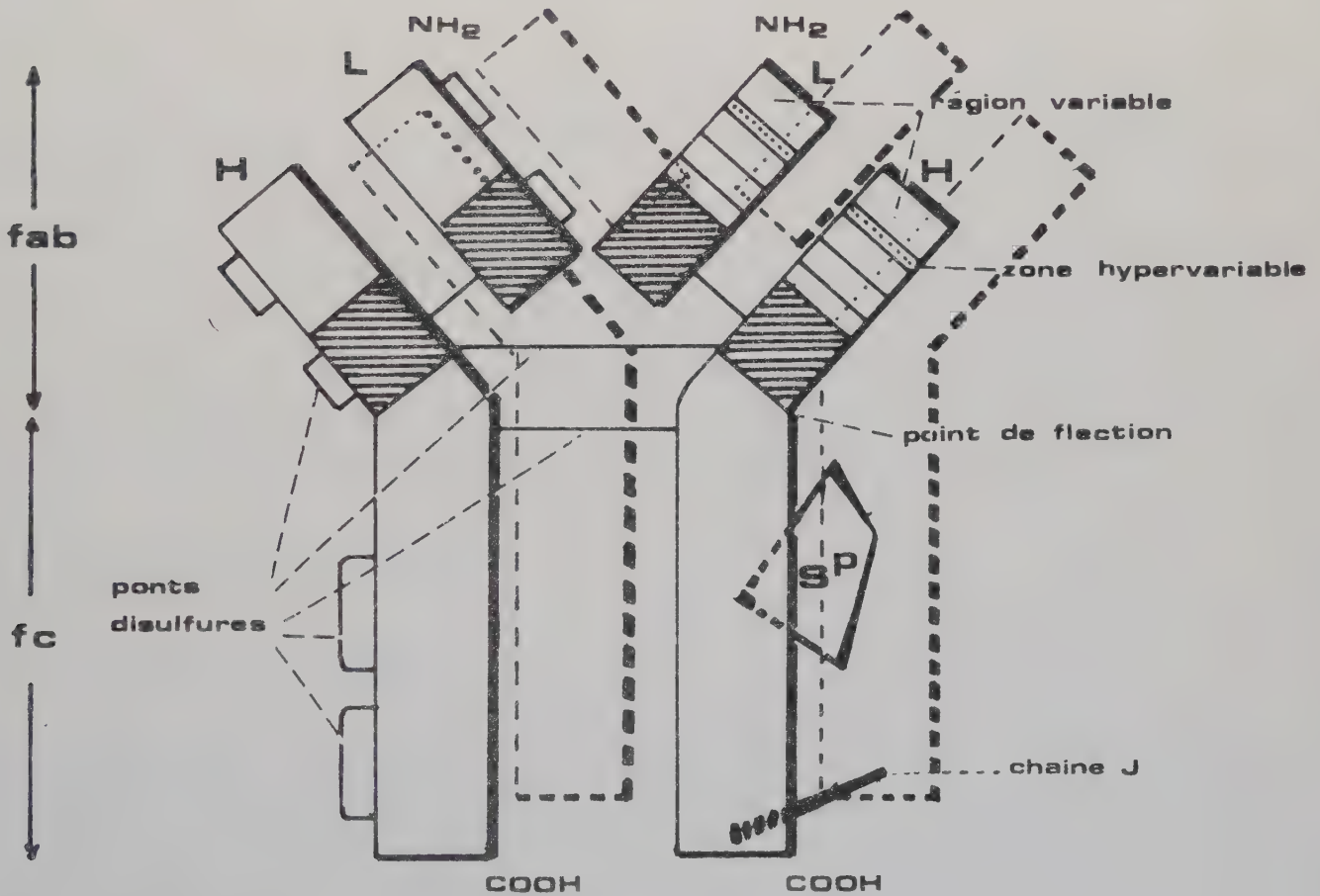


Figure 3 : Représentation schématique de l'IgAs

existe ailleurs que dans la rate ou les follicules lymphoïdes des cellules capables de synthétiser les IgA, ce qui revient à admettre la présence d'un système immunitaire local.

Le même auteur montre que l'IgA sérique marquée par l'iode radioactif et injectée à l'homme par voie veineuse n'est pas retrouvée dans la salive.

ROTHBERG (360) constate que la splénectomie n'empêche pas la réponse immunitaire à l'administration d'un antigène par voie orale, mais ne fait que retarder cette réponse, l'IgA étant alors synthétisée à d'autres niveaux.

En 1938 WALSH (443) avait déjà remarqué que les anticorps neutralisants des muqueuses de la cavité nasale étaient produits localement et que leur titre était plus élevé après une stimulation locale qu'après une vaccination par voie intrapéritonéale.

De son côté OGRA (294) remarque que l'introduction d'un vaccin antipoliomyélitique dans une anse intestinale isolée provoque la synthèse d'anticorps spécifiques au niveau de ce segment.

Les études effectuées in vitro par HURLIMAN (194,197), aussi bien que celles qui ont été réalisées in vivo par WALDMAN (439,440), BENVENISTE (41) et GOLDBERG (169), démontrèrent que la production d'IgAs se fait localement. Cependant RAMBAUD (340) et STROBER (389) laissent supposer qu'une partie de l'IgA locale pourrait provenir du sérum par simple transsudation, en faible quantité, il est vrai.

2) Lieu de synthèse des IgAs

a) Rôle des plasmocytes

La synthèse locale des IgAs au niveau des tissus entourant les cellules épithéliales engagées dans les processus de sécrétion (glandes mammaires, salivaires, intestinales, uréthrales, rectales et tractus respiratoire) a été mise en évidence par de nombreux auteurs dont HAZENBERG (181), BULL (80), GIRARD (168), BAZIN (31,32), BERGER (42), BAUR (27), BOURNE (58), BIENENSTOCK (48), BRANDTZAEG (59,60,70,73), BURDON (81) et SOUTH (378,379,380,381,384).

On doit à CRABBE (105) la découverte de l'extrême richesse en plasmocytes à IgA de la sous muqueuse intestinale humaine (en moyenne 352.000, 51.000 et 15.000 plasmocytes/mm³ respectivement pour l'IgA, l'IgM et l'IgG). BOURNE (58) observe les mêmes résultats chez le porc. VAERMAN (416,417,418,419,420,422,424,425) étudie par immunofluorescence les muqueuses digestives de huit espèces animales différentes; il les trouve peuplées, comme celles de l'homme, de nombreux plasmocytes à IgA, alors que les cellules à IgM et IgG sont en nombre restreint, contrairement à ce qu'on observe dans la rate et les ganglions lymphatiques. Ainsi les résultats obtenus sur le chien, le chat, la chèvre, le mouton, le porc, le cheval, le hérisson, permettent de conclure à une analogie avec l'homme.

O'DALY (288) a pu grâce à l'utilisation de marqueurs β , localiser les divers constituants de l'IgAs (chaîne α et SP) dans les cellules épithéliales des cryptes de lieberkühn au niveau de l'intestin grêle du lapin. LAWTON (236) montre que chez cet animal la synthèse de l'IgAs 11 S colostrale, sous forme dimérique, s'effectue directement dans des cellules particulières et non par polymérisation des IgA 7 S. Ceci n'implique nullement que SP soit synthétisé dans les mêmes cellules que la chaîne α et que la synthèse de l'une entraîne la synthèse de l'autre. MACH (251) par exemple, retrouve SP dans le lait des bovins plusieurs mois après la délivrance, alors qu'il n'y a plus d'IgAs. La preuve en est également donnée par certains patients agammaglobulinémiques (383) ou atteints d'ataxie-telangiectasie (250), chez ces derniers EDELMAN (136), ROCKEY (356), ROSSEN (357) et SOUTH (382) ont en effet mis en évidence la présence de SP libre en l'absence totale d'IgA. Il est à noter que l'IgM semble, d'une façon générale, prendre la relève dans les cas de déficience en IgA (320,64). Certains auteurs, dont BRANDTZAEG (64) admettent d'ailleurs l'existence d'un mécanisme sécrétoire commun pour les IgA et les IgM. YAGI (458) découvre chez l'IgA et l'IgM sérique, la présence d'un déterminant antigénique commun situé sur les fragments Fab de ces molécules. Il démontre ensuite avec ANDREW (11) que les synthèses des portions constantes et variables sont réglées par deux gènes différents. THOMSON (401) montre d'ailleurs que l'IgM est capable de complexer SP dans certaines conditions. En 1971 MESTECKY (267) découvre une chaîne polypeptidique commune à IgA et IgM, dont l'existence est confirmée en 1973 par SEON (371) et par BRANDTZAEG (72).

La démonstration par immunofluorescence de l'existence simultanée d'IgA et d'IgM dans les cryptes épithéliales de l'intestin, constitue un argument en faveur du rôle complémentaire de ces immunoglobulines dans la défense immunitaire locale. La synthèse de ces anticorps est fonction du nombre de plasmocytes intestinaux.

b) Synthèse des constituants de l'IgA

Du fait de sa structure symétrique la molécule d'IgA est synthétisée sous forme de dimère dans une même cellule lymphoïde. LAWTON (236,237,238) constate que l'IgA est effectivement symétrique chez le lapin, CURRY (115) retrouve ce même caractère chez l'IgA humaine. On a pu démontrer, d'autre part, qu'il y avait deux sites de synthèse différents pour IgA et pour SP, la chaîne T (SP) est synthétisée par des cellules en gobelets des épithéliums, tandis que l'IgA provient des plasmocytes présents dans les muqueuses sécrétoires (197,404,411,157).

En séparant par chromatographie sur Séphadex G-200 les fractions obtenues à partir de l'IgA colostrale de lapine traitée par la guanidine 5M, LAWTON (238) a isolé un fragment γ At pratiquement dépourvu de SP. Il démontre que ce fragment est capable, contrairement à l'IgA entière, d'induire la synthèse de SP. L'auteur conclut que le constituant γ At pourrait, en se fixant sur un récepteur de la membrane cellulaire épithéliale, servir d'inducteur spécifique de la synthèse de SP. SCHUBERT (372) trouve chez l'IgA et l'IgM deux sortes de chaînes lourdes, l'une contenant des glucides, l'autre en étant dépourvue; la chaîne porteuse de glucides peut être rencontrée à la fois dans les cellules et dans les immunoglobulines sécrétées, tandis que l'autre chaîne se trouve exclusivement à l'intérieur des cellules. La copule glucidique est fixée aux chaînes lourdes deux minutes après sa libération par les ribosomes. Aucun glucide ne peut être mis en évidence sur les chaînes légères, ce qui fait penser que ces glucides pourraient jouer un rôle dans le transport des chaînes.

La pièce J a été décelée par immunofluorescence dans les plasmocytes du chorion de la muqueuse intestinale par O'DALY (291) en même temps que la chaîne α , ceci tendrait à prouver que la pièce J est synthétisée et combinée à l'intérieur même de la même cellule, au dimère qui constituera l'IgAs.

3) Origine des plasmocytes à IgA

Le plasmocyte caractérisé par sa forme ovale et son noyau excentré avec de gros blocs de chromatine à la périphérie, possède un cytoplasme abondant, riche en acide ribonucléique et un réticulum endoplasmique très développé signe d'une synthèse protéique intense. Il reçoit l'information antigénique du macrophage par l'intermédiaire d'un ARN messager.

Les plaques de Peyer constituées d'amas de cellules lymphoplasmatocytaires, pourraient être à l'origine des plasmocytes à IgA. On a longtemps cherché un équivalent de la bourse de Fabricius des oiseaux, dans les formations lymphoïdes folliculaires associées à l'intestin. En fait BAZIN (37) souligne que ces organes rappellent les ganglions lymphatiques périphériques sans leurs réseaux afférents et efférents.

CRABBE (110), travaillant sur la souris axénique, montre que les immunocytes de la lamina propria apparaissent dans les zones les plus proches des plaques de Peyer. Pour CRAIG et CEBRA (92,112) ces formations chez le lapin contiendraient des précurseurs de plasmocytes à IgA. C'est la raison pour laquelle de nombreux auteurs cherchent, actuellement, à infirmer (50,52) ou à confirmer ces travaux (101,112,137,183, 211,431).

En résumé : L'IgA est synthétisée initialement sous forme de dimère symétrique, dépourvu de SP, par les plasmocytes de la lamina propria. L'origine de ces cellules est encore incertaine. La pièce sécrétoire n'intervient pas dans le processus de dimérisation; elle est synthétisée indépendamment dans les cellules muqueuses épithéliales.

4) Cinétique de la synthèse

ANDRE (10) a étudié la cinétique de la réponse immunitaire, au niveau de la rate, après absorption répétée d'un antigène par voie orale. Il remarque une augmentation du nombre des plaques forming cells (P.F.C.) à IgA vers le dixième jour. RAETTIG (338) montre que le taux de protection atteint sa valeur la plus élevée vers le dixième jour et demeure sensiblement au même niveau d'activité jusqu'au trentième jour. La courbe d'activité de phagocytose passe également par un maximum le onzième jour mais chute, en revanche, dès le seizième jour.

Il semble donc que le taux des macrophages et des plasmocytes à IgA soit le plus fort dans l'intestin vers le dixième jour qui suit la stimulation antigénique.

VI - DESTINEE DE L'IgA SECRETEE

La destinée de l'IgAs n'est pas encore élucidée de nos jours et demeure un sujet de controverses. Il semble que l'IgA secrétée localement dans la sous muqueuse intestinale, puisse suivre deux voies. La première serait représentée par les capillaires lymphatiques et la circulation générale, les IgA s'y trouvant sous forme d'IgA sériques. La seconde voie serait externe. Les IgA sortiraient de l'organisme en franchissant la barrière épithéliale intestinale sous forme de copro anticorps IgAs.

. Première voie : En 1970 BAZIN (31) montre qu'il est difficile de séparer le système immunologique sécrétoire intestinal du système immunologique général. En effet, les immunoglobulines de ces deux systèmes ont la même origine, du moins chez le chien et la souris, à savoir la muqueuse intestinale. En irradiant une portion d'intestin de souris, cet auteur (30,34,35,36) détruit l'épithélium et constate qu'il en résulte un effondrement du taux des IgA sériques.

CRABBE (106) rapporte trois cas de stéatorrhée avec déficience sélective des IgA sériques et sécrétoires.

Enfin, VAERMAN (420), chez le chien, étudiant la destinée des IgA dans la lymphe mésentérique et dans le sérum, compare les concentrations relatives des IgA, des IgM, de l'albumine, de la transferrine et de l'orosomucoïde. Toutes ces protéines, sauf les IgA, présentent un rapport $\frac{\log \text{concentration lymphe}}{\log \text{concentration sérum}}$ inférieur à 1 et directement proportionnel à l'inverse du log de leur poids molécule. En revanche, pour les IgA, ce rapport est supérieur à 1. L'auteur conclut que 80 p.100 des IgA de la lymphe mésentérique proviennent d'une synthèse locale au niveau de la muqueuse digestive, les 20 p.100 restant provenant du passage à travers les capillaires sanguins. Les plasmocytes de la muqueuse digestive du chien constituent donc la source principale des IgA sériques chez cet animal. Il s'agit là d'un argument favorable à la vaccination par voie orale.

. Deuxième voie : C'est la voie digestive avec traversée de la muqueuse intestinale après association à la pièce sécrétoire.

1) Lieu d'association de l'IgA et de SP

L'IgA est excrétée sous forme d'IgAs dans la lumière digestive. Rappelons cependant que SP et IgA sont synthétisés dans des sites différents mais peuvent être trouvés liés dans la lumière intestinale. Le mécanisme du passage de l'IgA du chorion de

la muqueuse vers la lumière intestinale est encore assez énigmatique. On a pu mettre en évidence des IgA associées à SP dans la lumière intestinale et ceci dans des cas où la pièce sécrétoire était absente de la muqueuse. Nous avons vu que SP était synthétisée par les cellules épithéliales intestinales, mais on ignore si l'union IgA-SP s'effectue au niveau de l'épithélium ou dans la lumière intestinale.

Bien que le lieu d'association de ces deux protéines ne soit pas encore défini, de nombreuses hypothèses ont déjà été émises en ce qui le concerne. Ainsi, ROSSEN (358) pense que l'IgA et SP sont produites par les mêmes cellules. Inversement, TOURVILLE, TOMASI et BRANDTZAEG situent SP uniquement dans l'épithélium.

TOURVILLE (411) pense que l'IgA pourrait diffuser à travers la membrane basale épithéliale, vers les espaces intercellulaires puis pénétrer dans les cellules épithéliales du cytoplasme avant d'être libérée dans la lumière intestinale. C'est au niveau de ces cellules épithéliales que s'effectuerait l'union IgA-SP, à moins qu'elle ne se fasse dans l'espace intercellulaire ou dans le lumen. LAWTON émet une hypothèse semblable après avoir observé que IgA et SP étaient produites par deux cellules différentes. Pour O'DALY (289), l'association spécifique de SP libre et de IgA laisse supposer que SP facilite le passage de l'IgA dimérique depuis la lamina propria jusqu'au lumen. Cependant le fait que SP soit présente dans des cellules épithéliales éloignées des cellules productrices d'IgA suggère d'autres rôles pour ce polypeptide. Il est certain qu'il protège l'IgA de l'attaque enzymatique et lui permet ainsi d'atteindre des zones riches en enzymes protéolytiques et d'y assurer son rôle d'anticorps.

MELCHERS (266) a également étudié la migration des IgA en incubant les plasmocytes en présence de leucine tritiée pendant 5 mn. Après ce traitement il transfère les cellules dans un milieu contenant un excès de leucine non marquée. La précipitation par des antisérums spécifiques permet alors de suivre les immunoglobulines marquées dans les diverses fractions subcellulaires. L'auteur constate que l'IgA est transportée depuis son site de synthèse jusqu'à l'extérieur de la cellule. En refaisant la même expérience en présence de glucides marqués au Tritium, il remarque que la glycosylation des chaînes polypeptidiques se fait dans des sites différents de ceux de la synthèse de la protéine. MELCHERS conclut que l'incorporation des glucides dans l'immunoglobuline se fait longtemps après que cette dernière ait été synthétisée, voire même juste avant qu'elle ne quitte la cellule. Il pense que la fixation des glucides intervient pour permettre à la protéine de franchir la membrane cellulaire. Cette hypothèse est partagée par SHUSTER (373). MELCHERS (266) souligne d'ailleurs que ce rôle des glucides a déjà été mis en évidence dans le cas des tyroglobulines.

2) Les différents schémas proposés

L'utilisation des techniques d'immunofluorescence a permis de proposer différents schémas pour expliquer la synthèse locale des IgA dans le tractus digestif.

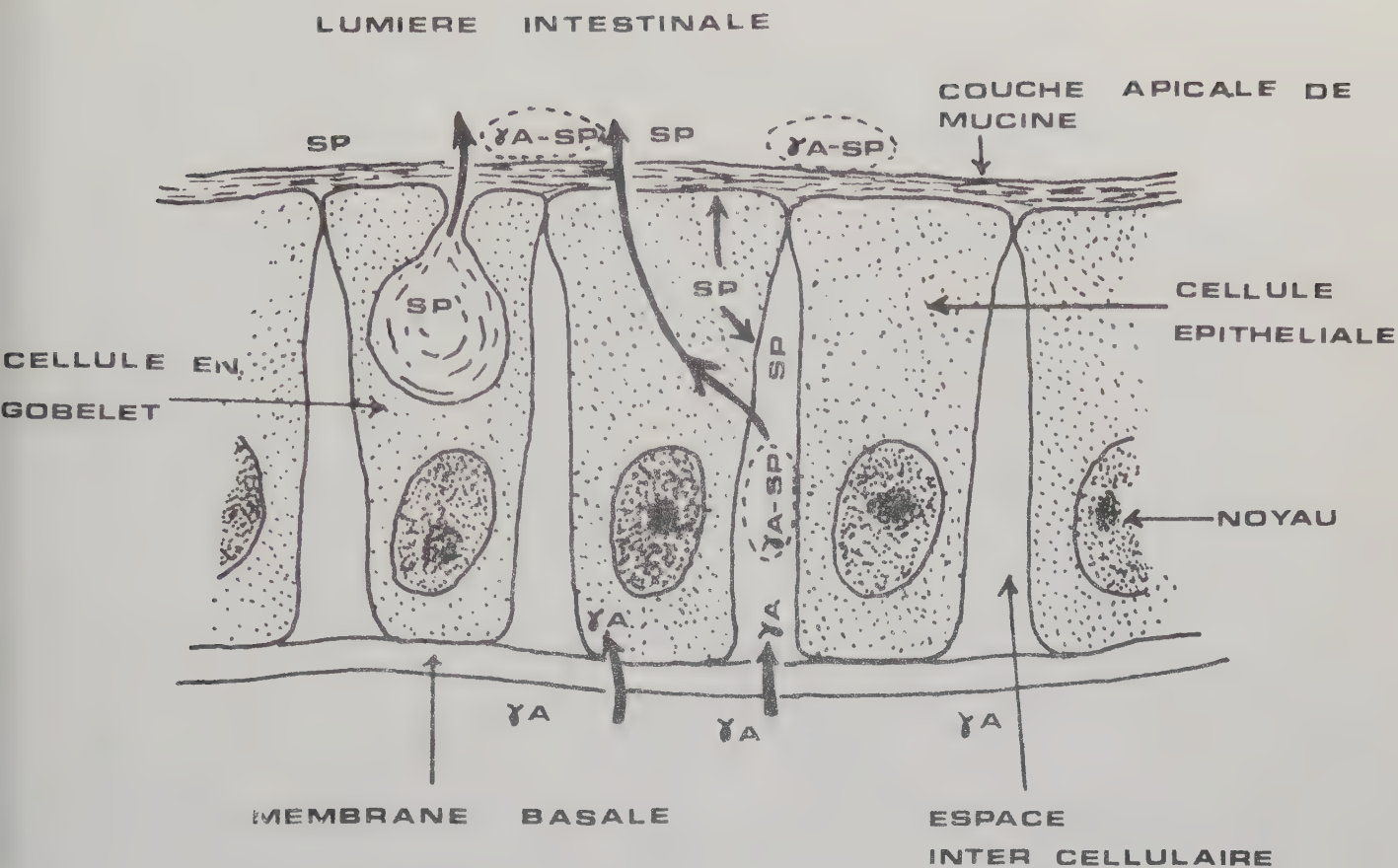
a) L'hypothèse de TOURVILLE (411) selon laquelle l'union IgA-SP s'effectuerait dans les espaces intercellulaires du chorion est illustré par la figure 4.

b) En 1973 COMOGLIO (99) en étudiant le transfert de l'IgAs à travers l'épithélium digestif de la souris, constate que les molécules d'IgA ne se trouvent pas dans les cellules des conduits sécrétoires ni dans les cellules en gobelets alors que SP peut être mise en évidence dans ces dernières. L'IgA et SP ont été retrouvées ensemble à la surface de la lumière intestinale. Ces résultats ont permis à COMOGLIO de proposer le schéma qui est donné en figure 5. Le transfert de l'IgA vers la lumière intestinale se fait à travers les cellules en plateaux et non le long des espaces interstitiels comme le proposait TOURVILLE. SP est libérée à partir des cellules en gobelet, elle se fixe aux chaînes d'IgA dans le lumen et favorise leur adsorption à la surface apicale de la membrane des cellules en plateaux.

c) ALLEN et PORTER (8) proposent en 1973 un schéma assez voisin de celui de COMOGLIO, tout en admettant comme TOURVILLE que le transfert des IgA se fait au niveau des espaces interstitiels. La figure 6 illustre cette hypothèse :

- en (I) un plasmocyte contenant IgA s'approche de la membrane basale épithéliale,
- en (II,III), la cellule projette un pseudopode à travers la membrane basale épithéliale et dépose une vésicule contenant IgA,
- en (III et IV), la vésicule pénètre dans la cellule épithéliale par un processus similaire à la micropinocytose et monte vers la zone supra nucléaire,
- en (VI) la vésicule est expulsée dans le lumen, soit par sécrétion apocrine (a) soit par sécrétion mérocrine (b).

En résumé, nous pouvons constater que ces théories n'ont pas encore permis de nos jours, de définir le mécanisme exact de transport de l'IgAs vers le lumen digestif ni celui de l'association entre SP et IgA.

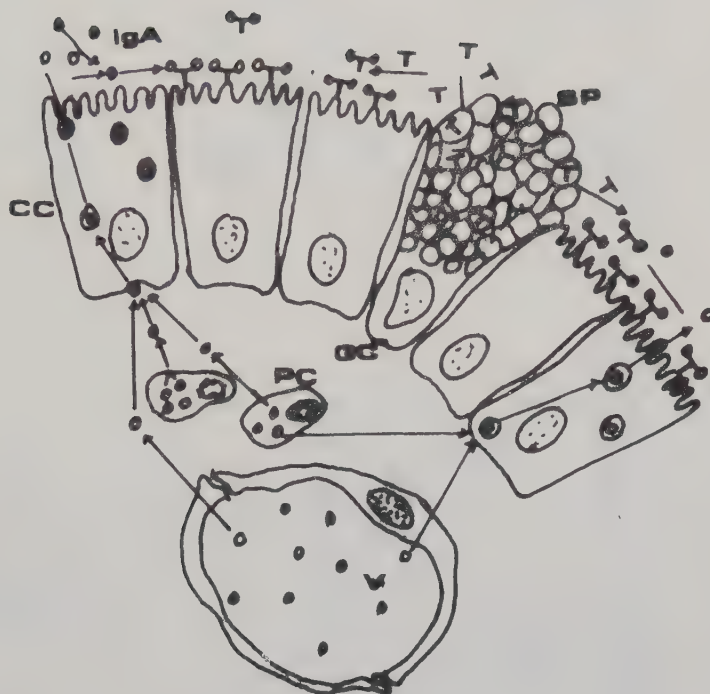


γA = Immunoglobuline A

SP = Pièce sécrétoire

FIGURE 4

REPRESENTATION SCHEMATIQUE DU TRANSPORT DES IgA ET DE SP A TRAVERS LA MUQUEUSE EPITHELIALE SELON TOURVILLE (411)



- | | |
|---------------------------|--------------------------|
| o : IgA | T, SP : Pièce sécrétoire |
| GC : Cellules en gobelets | CC : Cellules à plateaux |
| PC : Plasmocytes | V : Vaisseau sanguin |

Figure 5

Schéma du transfert d'IgA à travers l'épithélium intestinal de la souris selon COMOGGIO (99)

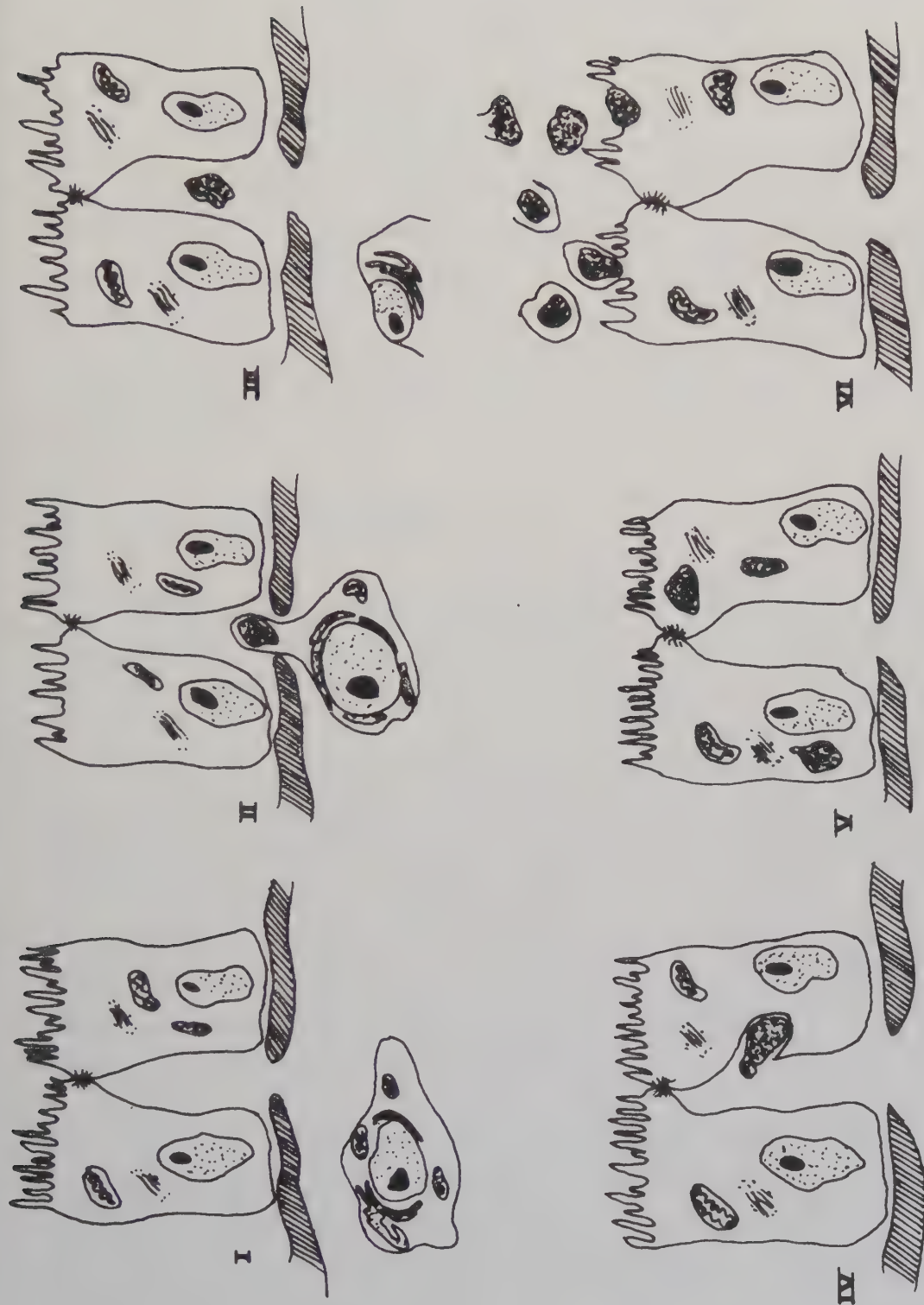


Figure 6 Schéma du transfert d'IgA à travers la paroi intestinale selon Allen et Porter (8)

VII - PROPRIETES DES IgAs

La structure compacte de l'IgAs résultant de la combinaison avec SP confère à cette molécule certaines propriétés particulières.

1) Résistance à la protéolyse :

Contrairement à l'IgA sérique, l'IgAs peut séjourner dans les liquides intestinaux, riches en enzymes protéolytiques, sans subir de dégradations importantes. En effet, STEWARD (388), UNDERDOW (415), SHUSTER (373) et TOMASI (407) constatent que l'IgAs résiste mieux à l'hydrolyse pepsique, papaïnique et trypsique que l'IgA sérique. Cette propriété semble liée à la configuration compacte imposée à la molécule d'IgAs par la présence de SP, mais aucune explication n'a pu être donnée au phénomène jusqu'à présent.

2) Activité anticorps :

On reconnaît habituellement à l'IgAs deux activités anticorps principales, une activité bactéricide spécifique (61,82,322,448) associée ou non au complément et au lysozyme et une activité antivirale (301).

L'IgAs ne fixe pas le complément, toutefois, des expériences récentes ont montré qu'elle se comporte comme une opsonine active envers les bactéries Gram négatif (la fraction C'3 est peut-être activée par le complexe IgA-antigène).

Selon GIRARD (166), PETRAKIS (305) et ADINOLFI (1) le lysozyme faciliterait la phagocytose des bactéries en présence d'IgA ou d'IgM. Enfin, pour REED (344) il semble que les propriétés bactériolytiques de l'IgAs exigent l'action concertée du complément, du lysozyme et de l'IgAs elle-même.

Chez des sujets atteints de bronchites chroniques, MEDICI (259) montre, par immunodiffusion que SP est absente des expectorations. La lésion de l'épithélium bronchique entraîne une perturbation dans la synthèse de SP. Il en résulte un défaut de sécrétion d'IgA 11 S active. SP serait donc un élément nécessaire à l'activité anticorps de l'IgAs.

Outre son rôle bactéricide ROSSEN (359) reconnaît à l'IgAs une activité antivirale. Celle-ci a été mise en évidence par KELLER (212,213), OGRA (294) et AKAO (4) dans la fraction IgAs des sécrétions duodénales de sujets infectés par un polio virus atténué, et au niveau respiratoire par BELLANTI (39) et OGRA (293).

Enfin, il semble que ces propriétés immunologiques soient sous dépendance hormonale. En effet, WADDELL (435) chez le rat et WARNER (444) chez le poulet, ont pu constater une chute des immunoglobulines et de la défense immunitaire après gonadectomie et bursectomie.

3) Spécificité de l'IgAs :

Ayant immunisé des volontaires par un aérosol de la souche A₂ du virus grippal WALDMAN (438) constate que les sécrétions nasales sont capables de neutraliser d'autres souches du même virus. Les IgAs auraient donc une spécificité moins étroite que les IgG. Cette propriété est d'une importance capitale puisque la vaccination locale entraînerait une immunité plus large que la vaccination intrapéritonéale dans la mesure où celle-ci entraîne une réponse spécifique. Bien qu'il ne l'ait pas démontré de manière certaine, RICHMAN (353) pense que l'IgAs est responsable de la protection contre le virus A₁ sans qu'il s'agisse d'un phénomène spécifique.

4) L'IgAs, protéine sérique :

Immunoglobuline prédominante des sécrétions externes, l'IgAs a été retrouvée également dans le sérum de sujets sains par BRANDTZAEG (66), THOMSON (400), WILSON (453), KIRSH (218) et WALDMAN (437). Le taux d'IgAs sérique serait de 5,2 µg/ml selon THOMSON (400) et de 30 à 40 µg/ml selon WALDMAN (437). Toutefois SWANSON (393) ne trouve pas d'IgAs dans le sérum.

Toutes atteintes ou affections des muqueuses sécrétoires, ulcères, entérocolites (qui selon KRAFT (226) peuvent être dues aux immunoglobulines elles-mêmes) vont entraîner des variations du taux des IgAs sériques. Ces variations sont interprétées de façons différentes selon les auteurs. Ainsi, pour POEN (310) les taux s'élèvent dans les affections intestinales, car la destruction du tissu épithélial empêche la formation de SP et le transport de l'IgA vers le lumen; ainsi la plus grande partie de l'IgA passerait alors dans la circulation. C'est la première hypothèse de cet auteur, mais il en propose une seconde selon laquelle l'élévation du taux des IgA sériques résulterait d'une stimulation antigénique intense.

Toutefois la majorité des auteurs dont CRABBE (106), NADORP (279), TWOMEY (413), TOMASI (405), BAZIN (35,36), THIERS (398), CERF (93), ASQUITH (17), WILSON (449) et BRUS (77), s'accordent pour conclure à une diminution du taux des IgAs à la fois au niveau du sérum et de la muqueuse intestinale. LEWIS (246) aboutit aux mêmes conclusions en ce qui concerne la muqueuse respiratoire.

L'IgAs a été trouvée à des taux très bas dans le sérum du cordon ombilical du nouveau-né (304). Il est de même reconnu actuellement (385,437) que le colostrum maternel transmet les immunoglobulines nécessaires à la défense du nouveau-né qui en est dépourvu à la naissance, au niveau intestinal. Ce rôle de transfert a été étudié chez l'animal par CURTIS (117), PORTER (312,313), RISTIC (355) et chez l'homme par CONNOR (100), ANSALDI (12) et IYENGAR (205). Si le passage des IgG semble confirmé par la plupart des auteurs, celui des IgA et IgM est beaucoup plus controversé.

VIII - DOSAGE DES IMMUNOGLOBULINES

La plupart des méthodes classiques de séparation et de dosage spécifique des protéines non enzymatiques ont déjà été appliquées aux immunoglobulines. Nous examinerons les résultats obtenus jusqu'à présent sans toutefois entrer dans le détail des modalités opératoires.

1°) Méthodes électrophorétiques :

a) Electrophorèse libre : La technique de séparation des protéines "par déplacement des frontières en milieu libre" décrite par TISELIUS en 1930, ne permet pas de séparer les différentes classes d'immunoglobulines, celles-ci se retrouvant groupées dans le bloc γ . Ce dernier ne fait que refléter l'évolution globale de ces protéines.

b) Electrophorèse de zone : Parmi les différents supports actuellement utilisables en électrophorèse de zone, ce sont les gels de polyacrylamide qui ont permis d'obtenir les meilleurs résultats. Cette méthode introduite par ORNSTEIN et DAVIS en 1964 (121) a subi au cours de ces dernières années des perfectionnements importants, dont les avantages et les inconvénients ont été largement décrits par LAMY et Coll. (233). Il s'agit essentiellement de l'électrophorèse discontinue (ou disc électrophorèse), caractérisée par la discontinuité du milieu électrophorétique, de l'électrophorèse en gradient de porosité et de l'électrophorèse en gradient de pH (isoélectrofocalisation).

PUSHKAREV et Coll. (323) ont pu séparer directement les trois classes d'immunoglobulines humaines par disc électrophorèse sur colonne de gel de polyacrylamide tandis que MARGOLIS et KENRICK (257) ont obtenu la séparation complète de ces protéines grâce à une technique bidimensionnelle comportant une disc électrophorèse, suivie d'une électrophorèse en gradient de porosité. D'autres méthodes de séparations bidimensionnelles ont été proposées dans le même but. C'est ainsi que DALE (119) et DEWAR (124) font suivre l'isoélectrofocalisation d'une électrophorèse conventionnelle, alors que WRIGLEY (456,457) utilise successivement l'électrophorèse en disque et l'isoélectrofocalisation. Il s'agit là de procédés intéressants sur le plan analytique mais d'exécution longue et délicate. De plus, ils se prêtent mal aux déterminations quantitatives.

2°) Méthodes chromatographiques :

La surface des pics obtenus en chromatographie étant proportionnelle à la quantité de soluté, cette méthode se prête bien au dosage des protéines à conditions qu'il ait à la fois une bonne résolution et une récupération satisfaisante; deux techniques ont donné des résultats intéressants dans la séparation des immunoglobulines.

a) La chromatographie d'exclusion :

Il s'agit d'un procédé de séparation des macromolécules solubles en fonction de leur taille. La solution à analyser est fractionnée par percolation à travers une colonne de gel non ionisé dont les dimensions des pores sont variables. Ces gels sont caractérisés par leur domaine de séparation (D.S.), c'est-à-dire la gamme de poids moléculaires pour lesquels on peut espérer obtenir une bonne séparation.

Sachant que les poids moléculaires des immunoglobulines se situent entre 16.000 et 900.000 daltons, les principaux gels du commerce utilisables pour leur séparation sont les suivants :

. La Sephadex G-200 (Pharmacia D.S. 5.000 à 800.000). C'est un gel de dextrane qui a été souvent utilisé, en particulier par PORTER (319,320) et VAERMAN (420). Il permet une bonne séparation des IgM; toutefois la résolution n'est jamais parfaite pour les IgA et les IgG, à moins de répéter les filtrations comme l'a fait VAERMAN (420). Il convient de souligner que ce gel est délicat à manipuler car il se tasse rapidement sous des pressions hydrostatiques supérieures à 10 cm d'eau.

. Le Sephadex G-150 (Pharmacia D.S. 5.000 à 400.000) est également un gel de dextrane. Il peut être utilisé pour un fractionnement préliminaire avant passage sur Sephadex G-200 (319).

. Le Biogel P-200 (Bio-Rad laboratories D.S. 30.000 à 200.000) est un gel de polyacrylamide peu utilisé à cause de sa grande sensibilité aux excès de pression hydrostatique.

. Le Biogel A 5 M (Bio-Rad laboratories D.S. 10.000 à 5.000.000) est un gel d'agarose qui permet la séparation des immunoglobulines mais, l'échelle de poids moléculaire utilisable étant très étalée, les pics obtenus sont aplatis et souvent contaminés.

. Le Biogel A 0,5 M (Bio-Rad laboratories D.S. 10.000 à 500.000) est un gel d'agarose, résistant bien au tassement, qui permet une bonne séparation des IgM et des IgG. Cependant, ces dernières peuvent être contaminées par des IgA.

. L'Indubiose Ae-A 22 ou Ultragel Ae-A 22 (I.B.F. - LKB, D.S. 6.000 à 1.200.000) est un gel mixte contenant 2 p.100 d'acrylamide et 2 p.100 d'agarose, présente l'avantage de bien résister au tassement.

b) La chromatographie par échange d'ions :

Il s'agit d'un procédé de séparation des protéines en fonction de leur charge électrique, par passage sur une colonne d'échangeur d'ions dont les groupements ionisables peuvent être de natures diverses, mais dont la matrice généralement organique, est constituée, soit par un polymère de synthèse soit par un polyside. Dans le cas des immunoglobulines on s'est servi principalement de dérivés ionisés de la cellulose ou des dextrans.

C'est ainsi que MACH (253), BUTLER (85) et PORTER (320) ont utilisé la DEAE, cellulose pour isoler la pièce sécrétoire à partir du lait d'ovins ou de bovidés. ZSCHÖKE (462) a proposé de son côté une méthode complexe de purification de l'IgA comportant un passage sur colonne de DEAE Sephadex A 50.

3°) Méthodes immunochimiques :

Nous grouperons dans la même rubrique les méthodes de dosage des immunoglobulines comportant l'utilisation d'immunsérums spécifiques. Il convient de souligner que la spécificité des antisérums du commerce n'est pas toujours parfaite. C'est ainsi que PHILIPS (306) constate que sur treize sérums anti IgA expertisés, neuf donnent une réaction positive avec l'IgA homologue. Il est toutefois possible de préparer soi-même des immunsérums. BAZIN (28) par exemple, immunise les souris avec de la ferritine de cheval puis injecte au lapin le précipité obtenu en mélangeant la ferritine avec l'immunsérum de souris. Il obtient ainsi un immunsérum de lapin réagissant contre toutes les immunoglobulines de souris. On peut fractionner ces immunsérums en les mettant en présence des différentes immunoglobulines de souris. Les précipités obtenus sont reinoculés à des lapins, ce qui permet d'obtenir des immunsérums de lapin spécifiques de chaque classe d'immunoglobulines de souris. Toutefois, si ces immunsérums ont une spécificité étroite en ce qui concerne les IgG et les IgM, il n'en est pas de même pour les IgA.

Les immunsérums spécifiques vont permettre de doser les différentes classes d'immunoglobulines soit par immunodiffusion soit par électroimmunodiffusion.

a) Immunodiffusion :

L'immunodiffusion en gélose décrite par OUDIN (297) en 1946 a subi depuis de nombreuses modifications, selon que l'on fait migrer l'antigène et l'anticorps l'un vers l'autre ou que l'on inclut l'anticorps dans un gel, dans lequel on fera migrer l'antigène.

La technique d'immunodiffusion double d'OUCHTERLONY (298) qui consiste à faire diffuser l'un vers l'autre l'antigène et l'anticorps, permet, en pratiquant des dilutions progressives de l'antigène, d'obtenir des résultats semi quantitatifs.

La technique d'immunodiffusion radiale mise au point par MANCINI (256), SKVARIL (374) et FAHEY (139) a été largement utilisée pour le dosage des immunoglobulines (319,175,459). Elle consiste à faire migrer l'antigène dans un gel d'agar contenant l'anticorps. L'antigène diffuse radialement autour du point de dépôt. Il se forme un complexe antigène-anticorps qui s'immobilise au point d'équivalence sous forme d'un anneau de précipitation dont le diamètre est proportionnel au log de la concentration en antigène. Une courbe étalon permet alors une détermination quantitative. Cette méthode précise a l'inconvénient d'un prix de revient élevé.

L'utilisation d'antigènes ou d'anticorps marqués par des isotopes radioactifs permet d'augmenter considérablement la sensibilité des méthodes de dosage des protéines par immunodiffusion.

b) Electro immunodiffusion :

L'analyse immunoélectrophorétique décrite en 1953 par GRABAR et WILLIAMS (171) ne donne que des résultats qualitatifs. Divers auteurs se sont attaché à rendre cette méthode quantitative tout en lui conservant ses avantages qui sont essentiellement la spécificité et la sensibilité.

Dans la technique d'électroimmunodiffusion de LAURELL (235) le gel d'agar est imprégné uniformément d'un antisérum monospécifique. Un antigène déposé sur ce gel et soumis à l'action d'un champ électrique, va développer un précipité sous forme de flamme allongée, dont la hauteur est proportionnelle à la quantité d'antigène. Une courbe établie à partir de solutions témoins, permet alors une détermination quantitative. HIRSCHAAMARIE (188) améliore la sensibilité de la méthode par une carbamylation préalable des échantillons.

Les travaux de RESSLER (347), PLATT (309) et ceux de CLARKE et FREEMAN (96) ont abouti à la mise au point d'une technique d'immunoélectrophorèse quantitative bidimensionnelle. L'analyse s'effectue en deux temps : les protéines sont d'abord séparées par électrophorèse en gel d'agar puis on les fait migrer sous tension, dans une direction perpendiculaire à travers un gel contenant cette fois un antisérum mono ou polyspécifique. Chaque couple antigène-anticorps donne un triangle dont la surface dépend de la quantité d'antigène présent.

Une dernière modification a été décrite par KROLL (229) en 1969. Il s'agit de la technique du tandem qui est en fait rigoureusement identique à la précédente dans son déroulement. Toutefois, au lieu d'avoir un seul puits de dépôt dans l'électrophorèse en première dimension, il y en a deux, un pour le mélange de protéines à étudier et un autre pour une protéine pure, bien définie. Le profil final en "bosse de chameau" permet de conclure à une identité entre le témoin interne et l'une des protéines du mélange. Dans le cas contraire on retrouve le profil en cloche vu précédemment jusqu'à la ligne de base.

Les techniques d'immunoélectrophorèse quantitatives ont été appliquées aux dosages des immunoglobulines par AXELSEN (20), MACCLELLAND (249).

c) L'Immunofluorescence :

Nous ne pouvons clore ce chapitre consacré au dosage des immunoglobulines sans mentionner la technique d'immunofluorescence qui, sans être une méthode quantitative, a rendu de grands services dans le contrôle histologique de l'immunité locale intestinale. Elle consiste à utiliser des antisérums spécifiques marqués soit à la rhodamine soit à la fluoresceïne. De nombreux auteurs dont ALLEN (5,6,8), TOURVILLE (411), COMOGLIO (99), ROSSEN (357,358), BRANDTZAEG (71) l'ont utilisée pour localiser les IgA et SP au niveau du chorion de la muqueuse intestinale. Il convient de souligner que cette technique doit s'entourer de nombreuses précautions pour éviter tout phénomène de fluorescence non spécifique.

En résumé : les méthodes de dosage que nous venons de citer ont permis de localiser, de fractionner et d'isoler les immunoglobulines sécrétoires, permettant ainsi de préciser leurs caractères physico-chimiques. Toutefois, ces techniques sont souvent peu adaptées à des prélèvements minimes et les immunsérums du commerce ne sont pas toujours monospécifiques. De plus, si l'importance de l'IgAs au niveau des muqueuses digestives est reconnue par de nombreux auteurs, de même que sa configuration structurale et chimique, un certain nombre de questions reste encore posé, concernant en particulier :

- le processus exact d'union de l'IgA et de SP et le niveau où il s'effectue,
- la façon dont l'IgA est transportée vers la lumière intestinale,
- enfin les mécanismes immunitaires au niveau intestinal et le rôle de l'IgAs.

DEUXIEME PARTIE

TRAVAUX PERSONNELS

CHAPITRE I

ETUDE DE LA PROTECTION DE LA SOURIS APRES VACCINATION PAR VOIE ORALE
A L'AIDE D'UNE BACTERIE PATHOGENE TUEE, D'UNE BACTERIE AVIRULENTE VIVANTE
ET D'UNE FRACTION ANTIGENIQUE

Pour pouvoir étudier les variations du taux des immunoglobulines sécrétoires et sériques après vaccination par voie orale, il nous fallait disposer d'un système expérimental commode. Nous avons choisi S. typhimurium qui provoque chez la souris une entéropathie assez voisine de l'infection typhoïdique humaine. Il était également nécessaire, dans un premier temps, de rechercher les conditions optimales de protection de l'animal contre une dose d'épreuve de bactéries virulentes. Nous disposions pour cela de trois sortes de vaccins,

- une souche pathogène tuée par la chaleur,
- un mutant avirulent de la même bactérie
- et enfin, un antigène vaccinant extrait du surnageant de culture de ce mutant.

Les résultats que nous rapportons ici concernent la recherche de la dose optimale de bactéries pathogènes capables de tuer la souris en un temps raisonnable ainsi que l'étude des variations du taux de protection obtenu, après vaccination orale à l'aide de ces trois vaccins administrés à des doses variables et suivant des rythmes différents. Ces résultats ont déjà fait l'objet de plusieurs communications (199,200, 201,202,203).

I - MATERIEL ET METHODES

1) Animaux : Les différents essais ont été effectués sur des souris Balb/c des deux sexes âgées de deux mois et pesant entre 18 et 20 g, des essais préliminaires ayant montré que le sexe n'avait pas d'influence sur le résultat. Ces souris provenaient toutes d'une colonie close entretenue au laboratoire. Une alimentation normale (croquettes UAR A03) leur a été fournie ad libitum durant toute la durée de l'expérience qui s'est déroulée dans une enceinte stérile. Les animaux étaient placés dans des cages recouvertes "d'Isocap" (BD.Mérieux) pour éviter la dissémination des bactéries pathogènes.

2) Vaccins :

a) Souche pathogène inactivée :

Pour la préparation du vaccin inactivé ainsi que pour l'administration des doses d'épreuve, nous avons utilisé la même bactérie pathogène. Il s'agissait de Salmonella typhimurium, souche C5S, provenant de l'Institut Pasteur de Paris. La virulence de cette souche hautement pathogène a été entretenue par passage sur la souris, compor-

tant l'injection intrapéritonéale d'une dose létale de la bactérie et le prélèvement stérile de la rate de l'animal dès la mort de ce dernier, des fragments de cette rate étant ensuite lyophilisés et conservés en ampoules scellées sous vide.

Les cultures de bactéries ont été réalisées en introduisant stérilement un fragment de rate lyophilisé dans un ballon contenant 130 ml de bouillon "Eugoubroth" (BD.Mérieux) qui a été ensuite maintenu à 37°C pendant 24 h.

Une numération des germes vivants et un contrôle de l'homogénéité de la culture ont alors été effectués sur boîte de Pétri. Un comptage des bactéries totales est pratiqué parallèlement à l'aide d'un compteur de particules (Coulter counter modèle F, Coultronic). La concentration bactérienne généralement obtenue était de $2,4 \times 10^8$ bactéries/ml.

Les caractères biochimiques de la souche ont été vérifiés sur chaque lot de culture grâce à la microméthode d'identification sur plaques API-50 décrite par BUISSIÈRE et NARDON (78,79).

L'inactivation du vaccin a été réalisée en chauffant à 63°C pendant 3 h le bouillon de culture préalablement réparti en ampoules de 10 ml. Le contrôle de la stérilité du vaccin a été effectué en ensemençant une des ampoules de chaque lot sur gélose S.S. en boîte de Pétri.

b) Souche avirulente vivante :

Comme vaccin vivant nous avons utilisé Salmonella typhimurium souche M 206 provenant de l'Institut Pasteur de Paris. Cette bactérie a été cultivée pendant 24 h à 37°C, dans un ballon contenant 130 ml de bouillon "Eugoubroth". Une partie aliquote de cette culture a été centrifugée à 3.000 t/mn pendant 10 mn, et le culot ainsi obtenu, repris dans 25 ml de surnageant. C'est à partir de cette suspension concentrée, contenant environ 4×10^{10} bactéries/ml, que nous avons, après numération des bactéries totales, préparé les différentes dilutions utilisées immédiatement pour la vaccination.

La numération totale des bactéries a été effectuée à l'aide d'un compteur électronique de particules (Coulter, modèle F Coultronic). Un comptage à posteriori des bactéries vivantes a été obtenu par la technique de dilution progressive sur boîte de Pétri. C'est ce dernier chiffre que nous avons retenu pour les tableaux de résultats.

Comme dans le cas précédent, les caractères biochimiques de la souche ont été vérifiés sur plaques API-50.

c) Antigène vaccinant :

L'antigène vaccinant a été isolé à partir du surnageant de culture de Salmonella typhimurium souche M 206, suivant un mode opératoire que nous avons déjà décrit (203) et dont nous rappellerons les principales étapes.

Des essais préliminaires ayant démontré l'importance de l'inoculum pour obtenir un rendement convenable en bactéries, nous avons d'abordensemencé 10 ml de milieu Eugonbroth qui après 24 h d'incubation à 38°C ont été transférés dans un ballon contenant 250 ml du même milieu. Cette seconde culture a servi ensuite à ensemencer 1,25 l de bouillon, qui après incubation dans les mêmes conditions ont été transférés dans un petit fermenteur (CHEMAP p.e.c.) contenant 13,5 l du même milieu. Après 24 h de culture, le contenu de ce petit fermenteur a servi à ensemencer un grand fermenteur (CHEMAP p.e.c.) contenant 135 l d'une solution aqueuse à 1,5 p.100 d'hydrolysate de caséine, 0,5 p.100 de peptone pancréatique, 0,4 p.100 de NaCl, 0,1 p.100 de citrate de sodium, 0,02 p.100 de cystine, 0,02 p.100 de sulfite de Na et 0,5 p.100 de glucose, ajusté au départ à pH 7,7. La température de la culture était de 38°C, l'oxygénation de 15 l d'air/mn et l'agitation de 1.200 t/mn.

Au bout de 28 h le contenu du fermenteur a été centrifugé à 16.000 t/mn sur centrifugeuse SHARPLES 16 RR, ce qui a permis de recueillir 430 g de culot bactérien humide et un surnageant de culture qui a servi à la préparation du vaccin (cf. figure 7).

Le surnageant a été filtré sur filtre presse SEITZ équipé de cinq plaques clarifiantes KoTh 7 et de cinq plaques filtrantes E.K.S.

La moitié du surnageant recueilli a été refroidi à + 2°C puis saturé en sulfate d'ammonium. Après 8 h de repos à la chambre froide, l'insoluble apparu à la surface a été séparé par décantation, remis en solution dans de l'eau et soumis à une dialyse de quatre jours contre l'eau du robinet, puis de 48 h contre de l'eau distillée. Une partie de la solution obtenue a été directement lyophilisée (fraction 3). L'autre partie a été passée sur ultrafiltre AMICON TC 5 D équipé de membranes XM-300. La fraction de P.M. > 300.000 (fraction 4) et celle de P.M. < 300.000 (fraction 5) ont été ensuite lyophilisées séparément.

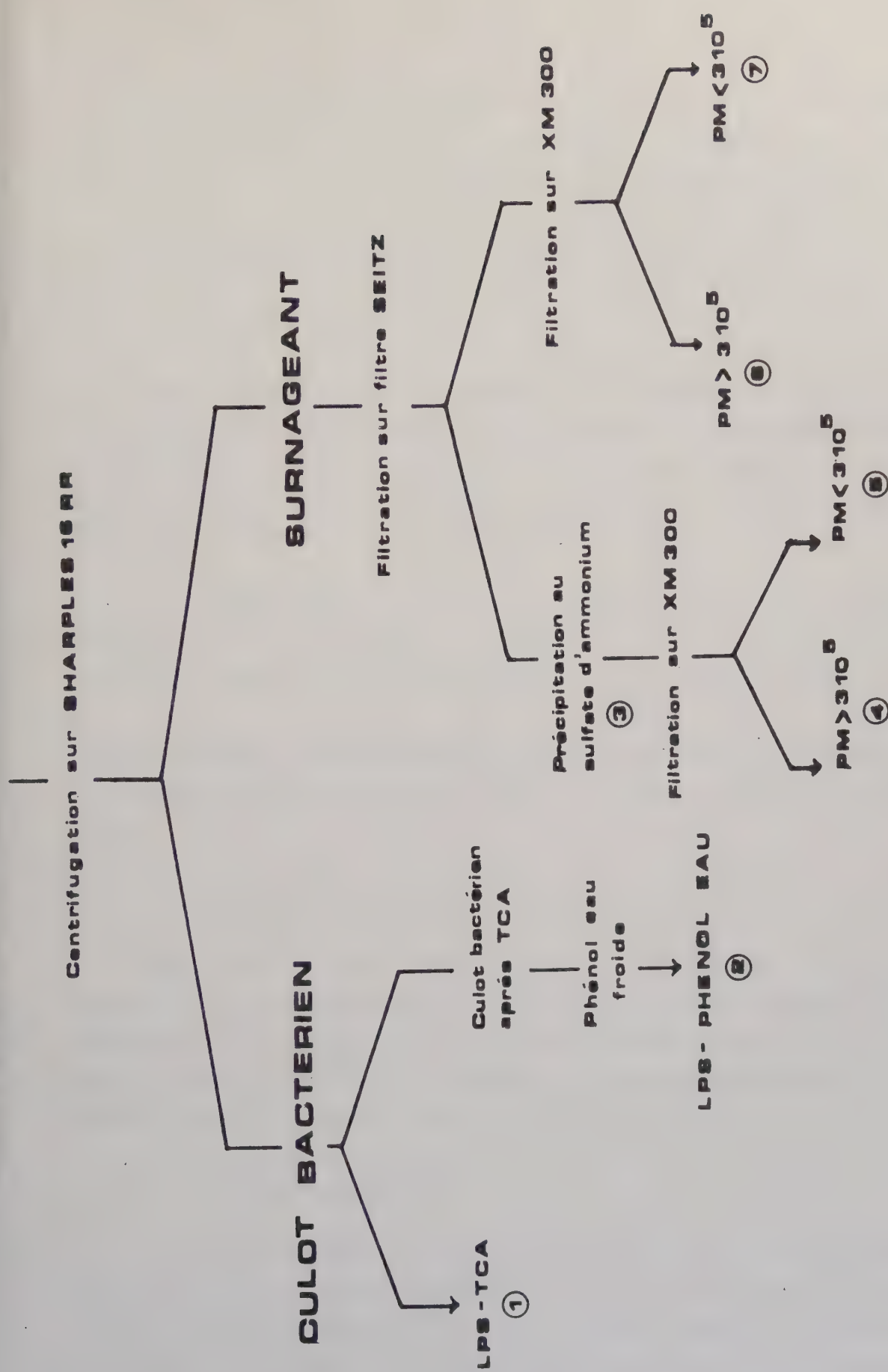


FIGURE 7 PREPARATION DES DIVERSES FRACTIONS A PARTIR D'UNE CULTURE DE *S. TYPHIMURIUM* M 206.

La seconde moitié du surnageant de culture a été passée directement sur ultra-filtre dans les mêmes conditions, ce qui a permis d'obtenir une fraction de PM > 300.000 (fraction 6) et une fraction de PM < 300.000 (fraction 7).

3) Protocole de vaccination :

a) Vaccin tué :

Pour rechercher la dose vaccinante la plus efficace nous avons essayé comparativement sept dilutions différentes de la suspension de bactéries pathogènes inactivées. Chaque animal a reçu par voie orale 0,5 ml de vaccin administré à l'aide d'une sonde oesophagienne adaptée à l'extrémité d'une seringue à insuline de façon à obtenir la plus grande précision dans l'appréciation du volume.

Une première série d'animaux a été vaccinée quotidiennement pendant 5 jours consécutifs. Une autre série a reçu le vaccin une fois par semaine pendant 4 semaines, enfin une troisième série a été vaccinée une fois par mois pendant 3 mois.

Chaque série était accompagnée d'un lot de souris témoins ne recevant qu'une dilution de bouillon par voie orale et d'un lot d'animaux vaccinés par voie intrapéritonéale.

b) Vaccin vivant avirulent :

Compte tenu des effets observés avec le vaccin tué, nous n'avons gardé pour le vaccin vivant que les vaccinations quotidiennes et hebdomadaires. Celles-ci ont été effectuées avec des dilutions de cultures fraîchement préparées. Les modalités opératoires étaient les mêmes que précédemment. Les doses administrées et la fréquence des vaccinations sont indiquées dans les tableaux de résultats.

c) Antigène vaccinant :

Après avoir vérifié par injection intrapéritonéale l'efficacité des différentes fractions isolées à partir du surnageant de culture de Salmonella typhimurium M 206, nous n'avons retenu, pour la vaccination par voie orale, que celles qui avaient donné les meilleurs résultats, c'est-à-dire les fractions de poids moléculaire les plus élevés (fractions 4 et 6). Pour ces essais nous n'avons pratiqué que des vaccinations quotidiennes répétées, avec une dose de 200 µg de vaccin par souris.

4) Epreuve :

Les animaux vaccinés par voie orale ont reçu par la même voie 30 jours après la dernière vaccination une dose létale de Salmonella typhimurium C5S. Le contrôle de la mortalité a été effectué pendant 25 jours consécutifs. Les résultats sont exprimés en pourcentage de survie des animaux de chaque lot et en durée moyenne de survie des animaux morts.

Lors des premiers essais, la dose d'épreuve était de 10^6 bactéries/souris. Les taux de survie observés étant alors trop faibles, nous avons, par la suite, abaissé cette dose d'épreuve aux environs de 10^4 bactéries/souris.

Certains lots d'animaux vaccinés ont été éprouvés en parallèle par voie I.P. afin de se référer aux conditions habituelles d'épreuve.

II - RESULTATS

1) Vaccin tué :

a) Etude des caractères biochimiques de Salmonella typhimurium souche C5S

Les caractères biochimiques de S.typhimurium souche C5S, déterminés par le procédé API, sont donnés par la figure 8.

Cette étude montre que la souche C5S de S.typhimurium possède les caractères, arabinose, ribose, galactose, glucose, levulose, mannose, mannitol, sorbitol, N acétylglucosamine, maltose, lactose, melibiose et thréhalose, très nettement positifs puisqu'ils apparaissent dès la 3ème heure. Les caractères positifs, glycérol, D+xylose, dulcitol, esculine, arginine, lysine, ornithine et citrate positifs n'apparaissent en revanche qu'au bout de 24 heures.

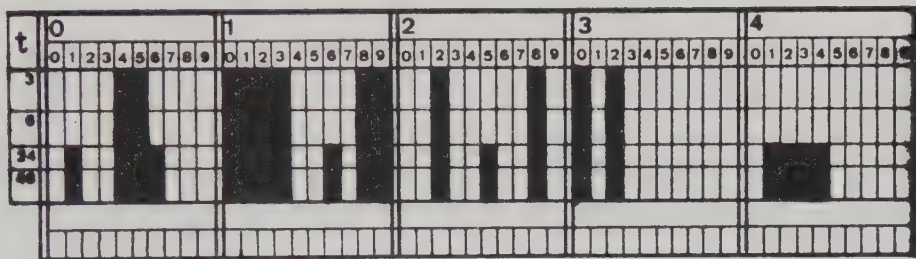


Figure 8 - Caractères biochimiques de S.typhimurium souche C5S.

*Le code des différents substrats est donné par le tableau VI.
Les cases noircies correspondent aux caractères positifs, avec leur
cinétique d'apparition relevée respectivement à la 3,6,24 et 48ème heure.*

	0	1	2	3	4
0	Rouge de phénol	Galactose	Méthyl-d-mannoside	D(+)-mélitiose	O N P G
1	Glycérol	D(+)-glucose	Méthyl-d-glucoside	Saccharose	Arginine
2	Erythritol	D(-)-levulose	N acétyl glucosamine	D(+)-tréhalose	Lysine
3	D(-)-arabinose	D(+)-mannose	Amygdaline	Inuline	Ornithine
4	L(+)-arabinose	L(-)-sorbose	Arbutine	D(+)-mélézitose	Citrate de sodium
5	Ribose	Rhamnose	Esculine	D(+)-raffinose	Thiosulfate de fer
6	D(+)-xylose	Dulcitol	Salicine	Dextrine	Urée
7	L(-)-xylose	Meso-inositol	D(+)-cellobiose	Amylose	Tryptophane
8	Adonitol	Mannitol	Maltose	Amidon	Tryptophane peptone
9	Méthyl-xyloside	Sorbitol	Lactose	Glycogène	Acide pyruvique

TABLEAU VI - Code des substrats API.

b) Etude du pouvoir létal de Salmonella typhimurium C5S administrée par voie orale à différentes doses :

Nombre de germes administrés	Nombre de morts en fonction du temps										Nombre d'animaux survivants	Durée moyenne de survie
	j + 1	j + 2	j + 3	j + 4	j + 5	j + 6	j + 7	j + 8	j + 9	j + 10		
1×10^3	0	0	0	0	1	3	2	2	1	1	0/10	7,2
1×10^4	0	0	0	1	1	2	2	2	1	1	0/10	7
1×10^5	0	1	0	1	2	2	2	2			0/10	5,8
1×10^6	0	1	3	2	2	1	1				0/10	4,2
1×10^7	0	3	2	2	1	2					0/10	3,7
1×10^8	0	6	1	1	1	1					0/10	3

TABEAU VII - Survie des animaux non vaccinés après administration de Salmonella typhimurium C5S.

Chaque animal a reçu la dose indiquée sous un volume de 0,5 ml.

Il apparaît que les animaux ont une D.M.S. (durée moyenne de survie) qui ne dépasse pas une semaine, cette DMS est inversement proportionnelle à la quantité de germes ingérés.

Le comportement de l'animal est fortement modifié après l'ingestion de la dose d'épreuve de S.typhimurium C5S. Les premiers symptômes sont d'ordre intestinaux, les crottes d'abord molles deviennent diarrhéiques, l'animal se déplace difficilement, refuse toute nourriture et se recroqueville, l'échine courbée, dans un angle de la cage. Le poil collé et humecté de sueur, semble hérissé, signe de forte température. L'animal meurt finalement après 3 à 7 jours, selon la dose administrée.

A l'autopsie, la rate est hypertrophiée, ferme et brunâtre; tandis que le foie présente souvent à sa surface de nombreux foyers nécrotiques jaunâtres.

c) Etude de la protection obtenue après vaccination par voie orale à l'aide de Salmonella typhimurium C5S inactivée :

Les résultats obtenus après vaccination orale quotidienne, hebdomadaire ou mensuelle sont donnés respectivement par les tableaux VIII, IX et X.

Nombre de germes administrés	Nombre d'animaux survivants	D. M. S.
1×10^3	1/10	8,3
1×10^4	1/10	6,7
1×10^5	1/10	10,1
1×10^6	0/9	10,7
1×10^7	1/9	12,6
1×10^8	2/10	10,3
Témoin i. p.	1/10	14,6
Témoin S. physiol	0/10	9,3

TABEAU VIII - Etude de la survie des souris après vaccination orale quotidienne.

Les animaux ont reçu quotidiennement pendant 5 jours consécutifs différentes doses de germes tués (sous un volume de 0,5 ml) et ont été éprouvés par 1×10^6 bactéries pathogènes un mois après la dernière vaccination. Un lot témoin n'a reçu aucun vaccin, un autre lot témoin a été vacciné par voie intrapéritonéale à l'aide de 1×10^6 bactéries tuées sous le même volume et au même rythme que les autres lots.

Il ressort de cet essai que les DMS les plus élevées sont obtenues avec les doses de vaccin les plus élevées. On peut noter, en outre, un léger pourcentage de survie dans chaque lot éprouvé.

Nombre de germes administrés	Nombre d'animaux survivants	D. M. S.
1×10^3	0/10	5,8
1×10^4	0/10	7,3
1×10^5	0/10	7,3
1×10^6	0/10	8,0
1×10^7	0/9	11,2
10×10^8	0/10	11
Témoin i. p.....	0/8	8,0
Témoin S. physiol.....	0/10	8,1

TABLEAU IX - Etude de la survie des souris après vaccination orale hebdomadaire.

Les animaux ont été vaccinés un fois par semaine pendant quatre semaines consécutives et éprouvés par 1×10^6 bactéries pathogènes un mois après la dernière vaccination.

La DMS est ici encore sensiblement proportionnelle à la dose de vaccin, mais aucun animal n'a survécu plus de 25 jours à la dose d'épreuve. Ces résultats sont donc inférieurs à ceux représentés dans le tableau VIII.

Nombre de germes administrés	Nombre d'animaux survivants	D. M. S.
1×10^2	0/9	6,1
1×10^3	0/8	8,1
1×10^4	0/10	6,7
1×10^5	0/9	4,6
1×10^6	0/9	7,7
1×10^7	0/10	5,2
1×10^8	0/9	10,4
Témoin i. p.....	0/5	10
Témoin S. physiol.....	0/9	8,4

TABLEAU X - Etude de la survie des souris après vaccination orale mensuelle.

Les animaux ont été vaccinés une fois par mois pendant 3 mois consécutifs et éprouvés un mois après la dernière vaccination par 10^6 bactéries/souris.

Cette vaccination mensuelle n'entraîne aucune survie des animaux éprouvés, et ne prolonge pas la DMS d'une manière significative.

d) Influence du délai d'administration de l'épreuve sur le taux de survie :

Nous avons voulu savoir dans quelle mesure le délai d'administration de l'épreuve modifiait la survie des animaux vaccinés. Ces eassais ont été réalisés sur des lots de souris ayant subi deux séries de vaccinations orales quotidiennes séparées par une semaine de repos. Les résultats obtenus sont donnés dans le tableau XI.

Nombre de germes administrés	Epreuve au 4 ^e jour		Epreuve au 30 ^e jour	
	Survie	D. M. S.	Survie	D. M. S.
1×10^7	1/12	9	3/12	10,55
1×10^8	0/11	9,2	0/9	12,77
Témoin bouillon...	0/10	8,4	0/7	8,3

TABEAU XI - Etude de la survie des souris après deux séries de vaccinations orales quotidiennes, séparées par une semaine de repos.

Les animaux ont été vaccinés oralement tous les jours pendant cinq jours consécutifs, soumis à un repos d'une semaine et revaccinés suivant le même rythme. La dose d'épreuve (1×10^6 bactéries/souris) a été administrée 4 jours après la dernière vaccination pour la première série et 30 jours après pour la deuxième série.

Il apparaît que les pourcentages de survie observés le 30ème jour sont supérieurs à ceux observés le 4ème jour, c'est-à-dire au moment où les facteurs non spécifiques devraient manifester une activité maximale. Il en est de même en ce qui concerne les DMS. A titre de référence nous avons également vacciné un lot de 10 souris dans les conditions habituelles à savoir deux injections I.p., à 15 jours d'intervalle, de 1×10^6 bactéries tuées. L'épreuve, pratiquée un mois après la seconde injection, avec 1×10^6 bactéries pathogènes vivantes, a donné un taux de survie de 0/10 et une DMS de 9,8.

L'histogramme de la figure 9 montre d'une manière très explicite les différences entre les DMS des animaux vaccinés et des animaux non vaccinés.

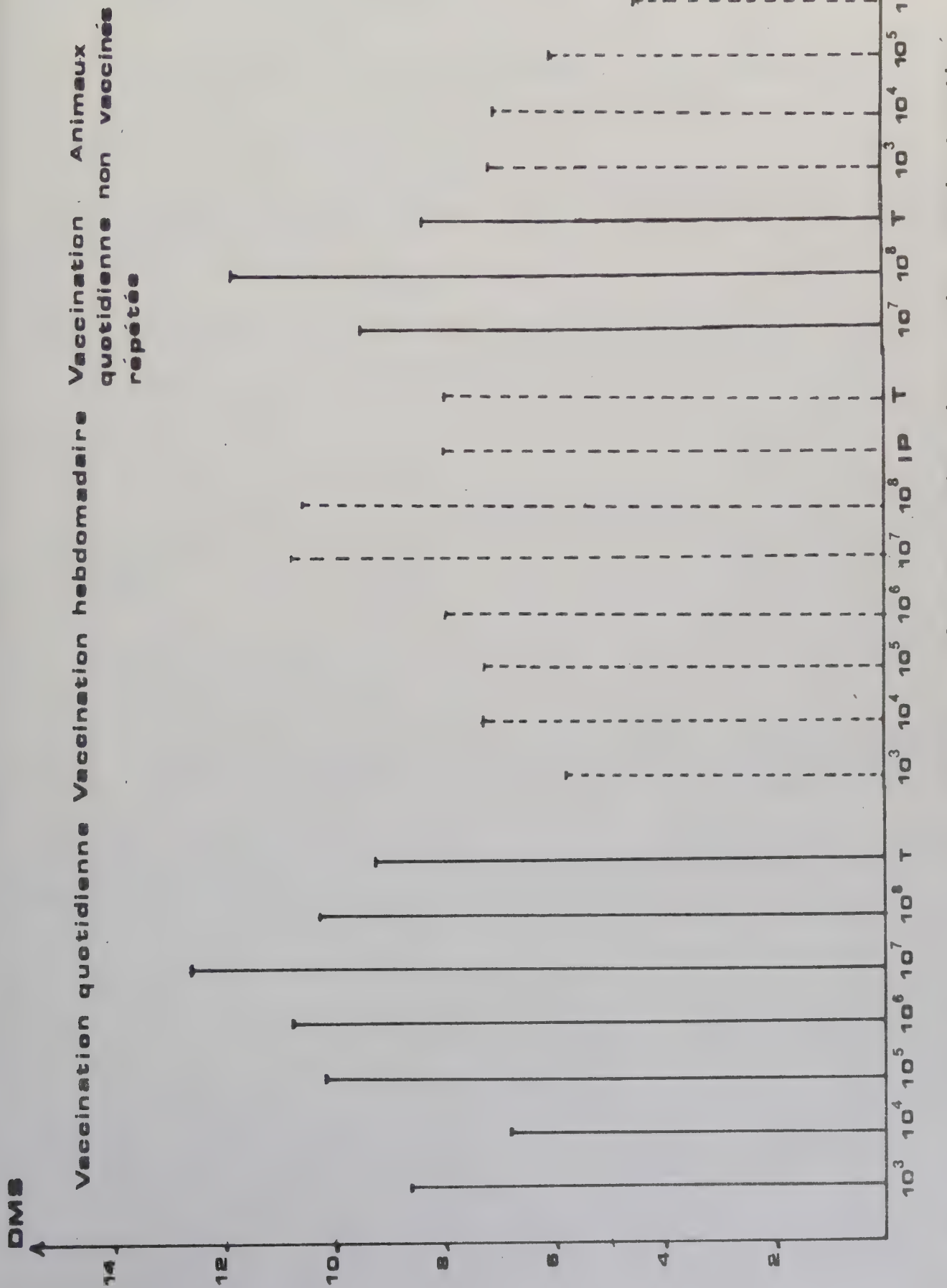


Figure 9 Histogramme des DMS en fonction des doses de vaccin inactive et de leur rythme d'administration.

Dans tous les cas les taux de survie que nous avons obtenus après vaccination se sont révélés assez faible, aussi avons nous adopté par la suite une dose d'épreuve moins élevées, voisine de 8 à 9.000 bactéries par souris.

Il était également intéressant de connaître le degré d'immunité des animaux vers le dixième jour, délai au bout duquel le taux de plasmocytes à IgA intestinaux serait le plus élevé (10,338).

Les résultats obtenus en vaccinant avec la souche pathogène inactivée sont donnés dans le tableau XII.

Nombre de germes administrés	Epreuve au 10 ème jour		
	survie	D.M.S.	% de survie
1 x 10 ⁷	3/20	10,5	15 %
Témoin	0/10	9,8	0 %
	Epreuve au 30 ème jour		
	survie	D.M.S.	% de survie
1 x 10 ⁷	9/18	11	50 %
Témoin	2/10	10	20 %

TABLEAU XII - Etude de la survie des souris après vaccination orale quotidienne.

Les animaux ont été vaccinés oralement tous les jours pendant 5 jours consécutifs. La dose d'épreuve (8.000 bactéries/souris) a été administrée 10 jours puis 30 jours après la dernière vaccination.

Ces résultats confirment ceux du tableau XI, mais les pourcentages de survie sont plus élevés du fait de la dose d'épreuve plus faible.

2) Vaccin vivant :

a) Etude des caractères biochimiques de Salmonella typhimurium souche M 206

Les caractères biochimiques de S.typhimurium souche M 206 déterminés par le procédé API sont donnés par la figure 10.

t	0										1										2										3										4										
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
3																																																			
6																																																			
24																																																			
48																																																			

FIGURE 10 - Caractères biochimiques de S. typhimurium M 206.

*Le code des différents substrats est donné par le tableau VI.
Les cases noircies correspondent aux caractères positifs, avec leur cinétique d'apparition relevée respectivement à la 3,6,24 et 48 ème heure.*

Cette étude montre que la souche M 206 de Salmonella typhimurium utilise les mêmes substrats que la souche C5S, mais présente un certain nombre de caractères positifs supplémentaires, à savoir : D(-)arabinose, rhamnose, D(+)cellobiose. On peut noter que le caractère thréhalose (+) apparaît ici plus tardivement (au bout de 24 h au lieu de 3 h pour la souche C5S).

b) Etude du pouvoir létal de Salmonella typhimurium souche M 206 administrée par voie orale à différentes doses :

Les résultats obtenus sont donnés dans la tableau XIII.

Nombre de germes administrés	Nombre d'animaux survivants	Durée moyenne de survie
2×10^1	10/10	
2×10^2	10/10	
2×10^3	10/10	
2×10^4	10/10	
2×10^5	10/10	
2×10^6	10/10	
2×10^7	10/10	
2×10^8	2/10	5,3
2×10^9	1/10	3,5

TABEAU XIII - Pouvoir létal de S.typhimurium M 206 administrée par voie orale.

Les animaux ont reçu les doses indiquées ci-dessus dans un volume de 0,5 ml/souris. La mortalité a été suivie pendant 14 jours.

On peut noter l'absence de pouvoir pathogène de la souche M 206; toutefois un phénomène de toxicité se manifeste pour les doses supérieures à 10^7 bactéries.

c) Etude de la protection obtenue après vaccination par voie orale à l'aide de Salmonella typhimurium, souche M 206 vivante :

Les résultats obtenus, après vaccination orale unique, vaccination quotidienne, simple et répétée, et vaccination hebdomadaire, sont donnés respectivement par les tableaux XIV, XV, XVI, XVII.

Nombre de germes administrés	Nombre d'animaux survivants	Durée moyenne de survie
1×10^1	1/10	12,22
1×10^2	2/10	12,37
1×10^3	0/10	10,5
1×10^4	1/10	12,11
1×10^5	1/10	11,22
1×10^6	2/10	10,62
1×10^7	1/10	12,77
Témoin bouillon	0/10	10,2

TABEAU XIV - Etude de la survie des souris après vaccination orale unique.

*Les animaux ont été vaccinés une seule fois et éprouvés par 1×10^6 bactéries pathogènes 30 jours plus tard.
Un lot témoin n'a reçu aucun vaccin.*

Le tableau XIV montre qu'une injection unique de vaccin vivant donne des taux de survie comparables à ceux obtenus avec des injections répétées de vaccin tué (tableau VIII).

Nombre de germes administrés	Nombre d'animaux survivants	Durée moyenne de survie	Pourcentage de survie
Dose d'épreuve 1×10^6 bactéries/souris			
1×10^3	0/20	10	0 %
1×10^5	6/26	12,1	23 %
1×10^7	11/30	13,8	37 %
Témoin bouillon	0/8	9,9	0 %
Dose d'épreuve = 9.000 bactéries/souris			
1×10^7	30/40	17,8	79 %
Témoin bouillon	12/40	9,8	30 %

TABLEAU XV - Etude de la survie des souris après vaccination orale quotidienne.

Les animaux ont été vaccinés quotidiennement pendant 5 jours consécutifs puis éprouvés 30 jours après la dernière vaccination soit par 1×10^6 bactéries/souris, soit par 9.000 bactéries/souris.

Le tableau XV montre que la meilleure protection est obtenue avec les plus fortes concentrations de vaccin. Pour une même dose d'épreuve les résultats observés ici sont très supérieurs à ceux donnés par le vaccin tué (cf. tableau VIII).

On peut constater également qu'en éprouvant les animaux avec une dose moyenne de bactéries pathogènes (environ 1×10^4 bactéries par souris) les taux de survie obtenus sont très significatifs.

Comme nous l'avions fait avec le vaccin tué (tableau XI), nous avons pratiqué une vaccination quotidienne répétée avec le vaccin vivant. Les résultats obtenus sont indiqués dans le tableau XVI.

Nombre de germes administrés	Nombre d'animaux survivants	D.M.S.	Pourcentage de survie
1×10^7	8/15	11	53,3 %
Témoin bouillon	1/10	10	10 %

TABLEAU XVI - Etude de la survie des souris après deux séries de vaccinations orales quotidiennes, séparées par une semaine de repos.

Les animaux ont été vaccinés oralement tous les jours pendant 5 jours consécutifs,

soumis à un repos d'une semaine et revaccinés suivant le même rythme. La dose d'épreuve de 8.000 bactéries/souris a été administrée par voie orale 30 jours après la dernière vaccination.

On peut constater que le rythme de vaccination n'apporte pas de protection supérieure à celle obtenue par la vaccination orale quotidienne simple (cf. tableau XV).

Nombre de germes administrés	Nombre d'animaux survivants	Durée moyenne de survie	Pourcentage de survie
Doses d'épreuve 1.500 bactéries/souris			
1×10^3	15/20	11	75 %
1×10^5	25/28	10,7	89,2 %
1×10^7	26/28	12,5	93 %
Vaccination i. p.	7/10	13	70 %
Témoin bouillon	5/10	17,7	50 %
Doses d'épreuve 9.000 bactéries/souris			
1×10^3	10/18	13,99	55,5 %
1×10^5	19/30	13	63,3 %
1×10^7	19/27	12,2	70,3 %
Vaccination i. p. (*)	2/10	9,35	20 %
Témoin bouillon	2/10	13	20 %

TABEAU XVII - Etude de la survie des souris après vaccination orale hebdomadaire.

Les animaux ont été vaccinés une fois par semaine, pendant 4 semaines consécutives et éprouvés 30 jours après la dernière vaccination avec 2 doses d'épreuves différentes.

(*) Les souris de ce lot ont reçu par voie intrapéritonéale une dose d'épreuve de 1.800 bactéries pathogènes.

Les résultats de la vaccination orale hebdomadaire donnés dans le tableau XVII montrent que les meilleurs taux de survie sont obtenus avec les plus fortes concentrations de vaccin et que la vaccination I.p. n'entraîne pas d'effet protecteur supérieur à celui conféré par la voie orale. La dose d'épreuve de 1.500 bactéries/souris apparaît ici un peu faible.

d) Influence du délais d'administration de l'épreuve sur le taux de survie :

Comme nous l'avons déjà fait pour le vaccin tué (tableau XII), nous avons voulu savoir dans quelle mesure le délai d'administration de l'épreuve influençait la durée de survie des animaux immunisés à l'aide du vaccin vivant.

Les résultats obtenus sont donnés dans le tableau XVIII.

Nombre de germes administrés	Epreuve au 10ème jour			Epreuve au 30ème jour		
	survie	D.M.S.	%	survie	D.M.S.	%
1 x 10 ⁷	36/50	11,6	72 %	40/50	12,6	80 %
Témoin bouillon	13/50	8,2	26 %	17/50	9,4	34 %

TABEAU XVIII - Influence du délai d'administration de la dose d'épreuve sur la survie des souris immunisées par le vaccin vivant.

Les animaux ont été vaccinés tous les jours pendant 5 jours consécutifs. Un lot de 50 souris a été éprouvé 10 jours après la dernière vaccination par 12.500 bactéries/souris. Un deuxième lot de 50 animaux a été éprouvé 30 jours après la dernière vaccination, par 20.000 bactéries/souris.

Il apparaît que, dans le cas du vaccin vivant, les différences des pourcentages de survie entre les lots témoins et les lots vaccinés sont identiques (46 %), que la dose d'épreuve soit administrée au 30ème ou au 10ème jour.

e) Efficacité comparée du vaccin tué et du vaccin vivant :

Afin de pouvoir mieux comparer le pouvoir protecteur du vaccin tué à celui du vaccin vivant, nous avons vacciné parallèlement deux lots de 40 souris qui ont été éprouvés ensuite dans les mêmes conditions.

Les résultats obtenus sont donnés à la fois dans le tableau XIX et la figure 11.

Nature du vaccin	Survie animaux	Pourcentage de survivants	Durée moyenne de survie
Tué 1×10^7 <i>S. typhimurium</i> souche C _h	21/38	55,2 %	13,5
Vivant 1×10^7 <i>S. typhimurium</i> souche M 206	30/38	79 %	17,8
Témoin bouillon	12/40	30 %	9,8

TABEAU XIX - Etude comparative du pouvoir protecteur du vaccin tué et du vaccin vivant.

Les animaux ont été vaccinés quotidiennement pendant 5 jours consécutifs, puis éprouvés par 9.000 bactéries/souris, 30 jours après la dernière vaccination.

Ces résultats mettent en évidence la nette supériorité du vaccin vivant sur le vaccin tué. Les pourcentages de survie obtenus confirment les valeurs que nous avons déjà trouvées au cours de l'étude particulière de chacun des vaccins.

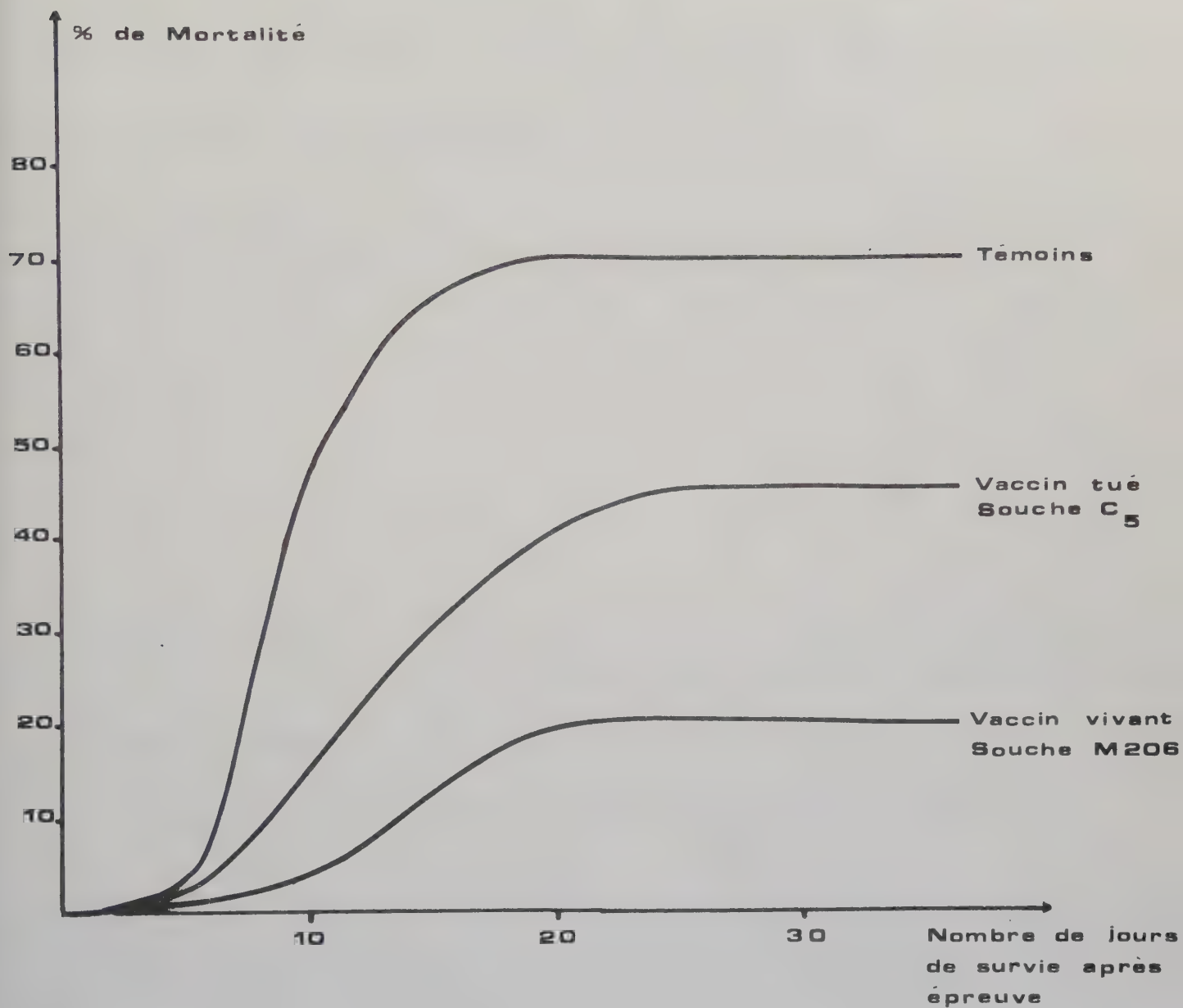


FIGURE 11 :
EFFICACITÉ COMPARÉE DU VACCIN
VIVANT ET DU VACCIN TUÉ.

f) Contrôle supplémentaire de la virulence de la souche C5S de Salmonella typhimurium :

Ayant constaté, au cours de l'étude du vaccin vivant, une légère diminution de la virulence de la souche pathogène C5S, nous avons refait un contrôle du pouvoir létal de cette bactérie, suivant le même protocole que celui utilisé dans le tableau I.

Les résultats obtenus sont indiqués dans le tableau XX

Nombre de germes administrés/souris	Nombre de morts en fonction du temps										Nombre d'animaux survivants	Durée moyenne de survie
	J+1	J+2	J+3	J+4	J+5	J+6	J+7	J+8	J+9	J+10		
1 x 10 ³	0	0	0	0	0	0	2	2	1	2	3/10	8,4
1 x 10 ⁴	0	1	0	0	0	1	2	6	1		0/11	8,0
1 x 10 ⁵	1	0	0	0	3	1	3	1	1		0/10	6,0
1 x 10 ⁶	2	0	2	0	0	2	4				0/10	4,8
1 x 10 ⁷	0	1	0	1	1	4	3				0/10	5,6
1 x 10 ⁸	3	1	0	1	2	3					0/10	3,7

TABEAU XX - Etude de la survie des animaux non vaccinés.

Chaque lot de souris a reçu, par voie orale, les doses indiquées, dans un volume de 0,5 ml/souris.

On peut noter un léger décalage des D.M.S. par rapport aux valeurs obtenues précédemment. Ce décalage, ainsi que la modification du taux de survie du "lot 10³" peuvent être attribués à une légère perte de virulence de la souche C5S.

3) Antigène vaccinant

a) Etude du pouvoir protecteur des différentes fractions administrées par voie intrapéritonéale :

Avant d'entreprendre une vaccination par voie buccale à l'aide des fractions antigéniques isolées du surnageant de culture de la souche M 206, nous avons étudié leur pouvoir protecteur par les méthodes habituelles, c'est-à-dire en administrant le vaccin et la dose d'épreuve par voie intrapéritonéale.

Les résultats obtenus sont donnés dans le tableau XXI.

Fraction vaccinnante	Dose d'épreuve (bactéries/souris)	Taux de survie	Durée moyenne de survie
3	1.300	2/10	8,5
4	600	0/10	13,1
	1.300	1/10	8,9
5	600	1/10	9
	1.300	0/10	6,5
6	1.300	0/20	7
7	1.300	0/9	8,5
Témoins non vaccinés	600	0/10	5,5
	1.300	0/10	4,2

TABLEAU XXI - Etude de la survie des souris vaccinées par voie intrapéritonéale.

Les animaux ont reçu chacun deux injections de 200 µg de vaccin à 15 jours d'intervalle et ont été éprouvés par voie I.p. 30 jours après la dernière vaccination.

La meilleure protection est obtenue en utilisant comme vaccin soit le précipité brut obtenu en saturant le surnageant de culture par le sulfate d'ammonium (fraction 3) soit les constituants macromoléculaires isolés à partir de ce surnageant (fractions 4 et 6). Les fractions 1 et 2 (figure 7) qui correspondent à l'endotoxine de la bactérie n'ont pas pu être utilisées valablement pour ces essais de part de leur très grande toxicité.

b) Etude du pouvoir protecteur des fractions 4 et 6 après vaccination par voie orale :

Nous n'avons retenu pour cet essai que les fractions macromoléculaires qui se sont révélées efficaces dans la vaccination par voie intrapéritonéale (fractions 4 et 6).

Fractions vaccinales	Doses d'épreuve	Survie	D.M.S.	Pourcentage de survie
4	9.000	16/40	13	40 %
Témoin non vacciné	9.000	0/10	12	0 %
6	7.000	5/10	13,6	50 %
Témoin non vacciné	7.000	2/10	12	20 %

TABLEAU XXII - Etude de la survie des animaux après vaccination et épreuve par voie orale.

Les animaux ont reçu quotidiennement 200 µg de vaccin chacun pendant 5 jours et ont été éprouvés par voie orale, 30 jours après la dernière vaccination soit par 9.000 soit par 7.000 bactéries/souris.

Les fractions utilisées se révèlent plus efficaces dans la vaccination par voie orale que dans la vaccination par voie intrapéritonéale.

III - DISCUSSION

L'étude de la protection de la souris après vaccination par voie buccale à l'aide de la souche pathogène inactivée C5S de Salmonella typhimurium nous a permis de définir une dose optimale de vaccin qui se situe entre 10^7 et 10^8 bactéries tuées (tableaux VIII, IX, X, figure 9). Elle montre, d'autre part, que la vaccination la plus efficace est celle qui est effectuée quotidiennement pendant cinq jours consécutifs (tableaux VIII, XI), le degré d'immunité atteint étant alors sensiblement identique voire même supérieur, à celui que confère la vaccination par voie intrapéritonéale.

Comme intervalle de temps séparant l'épreuve de la vaccination, nous avons choisi un délai d'un mois, en tenant compte du fait que cette période correspond selon GIRARD (166) et ANDRE (10) à un maximum d'activité anticorps intestinale liée aux IgA. C'est aussi le temps au bout duquel MYNARD (278) observe la meilleure protection chez le rat, après administration d'un vaccin TAB par voie buccale. D'après STERNE et TRIM (387) la durée de la période séparant l'épreuve de la vaccination ne doit pas être, de toute façon, inférieure à 14 jours si l'on veut éviter l'interférence des facteurs non spécifiques.

Les résultats que nous avons obtenus en modifiant le délai d'administration de la dose d'épreuve (tableaux XI, XII) montrent que le pourcentage de survie des animaux vaccinés est supérieur vers le trentième jour à celui observé soit au dixième soit au quatrième jour, c'est-à-dire à un moment où les facteurs non spécifiques devaient manifester une très grande activité.

Dans l'ensemble les taux de survie que nous avons relevés chez les animaux éprouvés se montrent inférieurs à ceux obtenus par RAETTIG (332, 337) ou MARWIK (258) avec d'autres souches de la même bactérie et ceci bien que ces auteurs aient administré leur dose d'épreuve par voie intrapéritonéale. Cette différence s'explique certainement par le fait que nous avons utilisé une souche extrêmement virulente (tableau VII) à des doses d'épreuve relativement élevées (10^6 bactéries/souris). En effet, il nous a été également possible d'obtenir dans certains cas un nombre significatif de survivants, à condition d'abaisser considérablement la dose d'épreuve (aux environs de 10^3 bactéries/souris). D'autres facteurs tels que l'origine des souris (N.H.R.I. au lieu de Balb/c) et la durée de l'observation (5 jours au lieu de 25) peuvent expliquer les résultats apparemment plus favorables obtenus par RAETTIG et Coll. (258, 332, 337).

Dans le cas de la vaccination de la souris par voie orale à l'aide de la souche avirulente vivante M 206 de Salmonella typhimurium la dose optimale de vaccin se situe également vers 10^7 bactéries, les doses supérieures présentant une certaine toxicité pour l'animal (tableau XIII). C'est aussi l'administration quotidienne de vaccin pendant cinq jours consécutifs qui donne les meilleurs résultats (tableau XV). Toutefois, la vaccination hebdomadaire pendant quatre semaines consécutives conduit à des taux de survie presque aussi importants (tableau XVII).

En faisant varier la dose d'épreuve de bactéries pathogènes, on constate que les résultats les plus significatifs sont obtenus en administrant à chaque souris environ 8.000 bactéries (tableaux XV à XIX). Cette dose d'épreuve plus faible que celle que nous avons utilisée au cours des premiers essais, permet de souligner la nette supériorité du vaccin vivant sur le vaccin tué, (tableau XIX). Dans tous les cas, le degré de protection obtenu est identique, sinon supérieur à celui que confère la vaccination par voie intrapéritonéale. Ces résultats se montrent en accord avec ceux de KURLOVA (231).

L'idée que les vaccins vivants confèrent une meilleure résistance à l'infection que les vaccins tués repose sur de nombreux travaux (cf. 295). Elle a été vérifiée en particulier sur la souris par MEL (260) avec Shigella flexneri et sur l'homme par

TERZIN (396). On peut cependant noter que les essais pratiqués sur la souris avec Salmonella typhimurium par BARON et FORMAL (26) n'ont pas abouti aux mêmes conclusions. Cette divergence s'explique probablement par le fait que ces auteurs ont utilisé, pour l'immunisation, un mutant streptomycino dépendant, donc une souche différente de la nôtre.

Nous avons noté que dans la plupart des travaux la dose d'épreuve est administrée entre le dixième et le treizième jour suivant la vaccination, c'est-à-dire à un moment où le taux de plasmocytes à IgA est élevé, mais où les facteurs non spécifiques de l'immunité peuvent manifester une activité importante. Nous avons donc étudié comparativement le pouvoir protecteur du vaccin vivant au dixième et au trentième jour, seuls les facteurs spécifiques devant intervenir dans le second cas. Les résultats obtenus (tableau XVIII) montrent que les taux de protection sont sensiblement identiques dans les deux lots. L'épreuve au trentième jour peut donc être considérée comme valable pour l'essai d'efficacité des vaccins buccaux chez la souris.

Le pouvoir protecteur de Salmonella typhimurium paraît être lié à une fraction antigénique que nous avons mise en évidence dans le surnageant de culture de la souche M 206. Il est intéressant de noter que cet antigène vaccine plus efficacement la souris par voie orale que par voie intrapéritonéale puisqu'on observe une augmentation du taux de survie des animaux dans le premier cas, alors qu'on ne constate qu'une légère prolongation de la durée moyenne de survie dans le second cas (tableaux XXI et XXII). Ces résultats concordent donc avec ceux que nous avons obtenus au cours des essais d'immunisation de la souris par la souche pathogène inactivée ou par le mutant avirulent vivant. Ils confirment l'idée actuellement admise de la supériorité de la vaccination par voie buccale pour la protection contre les entérobactéries pathogènes (227,231).

L'étude de la structure de cet antigène vaccinant sortait du cadre de ce travail, nous n'en parlerons donc pas ici. Cependant les résultats des essais d'immunisation de la souris à l'aide des diverses fractions isolées à partir de la préparation antigénique brute (tableau XXII), montrent que l'antigène protecteur est un constituant macromoléculaire, tout comme celui que CREACH, FOURNIER et FONTANGES (114) ont isolé à partir du surnageant de culture de Yersinia pestis EV 40.

On peut noter que certaines fractions antigéniques extraites de la bactérie entière se sont déjà révélées capables de protéger la souris contre une infection expérimentale par Salmonella typhimurium. C'est le cas, par exemple, de l'antigène commun des entérobactéries étudié par GORZYNSKI (170) et de l'antigène protéique de la paroi étudié par BARBER (23,24). Il s'agit de préparations qui ont manifesté un pouvoir protecteur après infection intrapéritonéale mais chez des souris différentes des Balb/c. Or, il est bien connu que toutes les souches de souris ne répondent pas de la même manière aux antigènes des Salmonelles (19).

IV - CONCLUSION

Pour rechercher les meilleures conditions d'immunisation de la souris par voie buccale contre une infection expérimentale par Salmonella typhimurium, nous avons utilisé trois vaccins différents en faisant varier les doses administrées, le rythme de vaccination et l'intervalle de temps séparant celles-ci de l'administration, par la même voie d'une dose d'épreuve de bactéries pathogènes.

Les résultats obtenus montrent que la vaccination la plus efficace est celle qui est pratiquée quotidiennement pendant cinq jours consécutifs. Toutefois, le degré de protection varie considérablement en fonction de la nature du vaccin utilisé.

Lorsque celui-ci est constitué par la bactérie pathogène (*Salmonella typhimurium* C₅S) inactivée par la chaleur, on observe qu'une prolongation de la durée moyenne de survie des animaux éprouvés, les taux de survie n'étant significatifs que dans le cas où la dose d'épreuve est relativement faible.

En revanche, si on utilise comme vaccin une souche avirulente vivante (*Salmonella typhimurium* M 206) les pourcentages de survie obtenus deviennent très importants.

Une fraction antigénique isolée à partir du surnageant de culture de la souche M 206 s'est montrée légèrement moins efficace que la bactérie vivante pour protéger la souris.

Il est particulièrement intéressant de souligner que les résultats de la vaccination par voie buccale ont été identiques, voire même supérieurs à ceux de la vaccination par voie intrapéritonéale pratiquée en parallèle.

En ce qui concerne l'intervalle de temps séparant la vaccination de l'épreuve, nous avons constaté que la protection est aussi nette au trentième qu'au dixième jour.

CHAPITRE II

ETUDE DE LA VARIATION DU TAUX DES IMMUNOGLOBULINES INTESTINALES
ET SERIQUES APRES VACCINATION PAR VOIE BUCCALE.

INTRODUCTION

Ayant constaté que le vaccin vivant était plus efficace que le vaccin inactivé pour la protection de la souris contre une infection expérimentale par Salmonella typhimurium, nous avons cherché à savoir si ces deux types de vaccins modifiaient différemment le taux des immunoglobulines intestinales ou sériques. Pour cela, nous avons dosé comparativement les principales classes d'immunoglobulines dans les liquides de lavages intestinaux ainsi que dans les sérums provenant d'animaux sacrifiés soit avant la vaccination, soit dix jours, soit encore trente jours après cette dernière.

Il nous a paru intéressant également d'examiner l'évolution de ces protéines anticorps chez les souris qui avaient survécu à l'administration d'une dose d'épreuve de bactéries pathogènes.

Enfin, ne disposant pas de méthode spécifique pour le dosage des IgA sécrétoires (IgAs), nous avons complété celui des IgA par un contrôle histologique au niveau de la muqueuse intestinale.

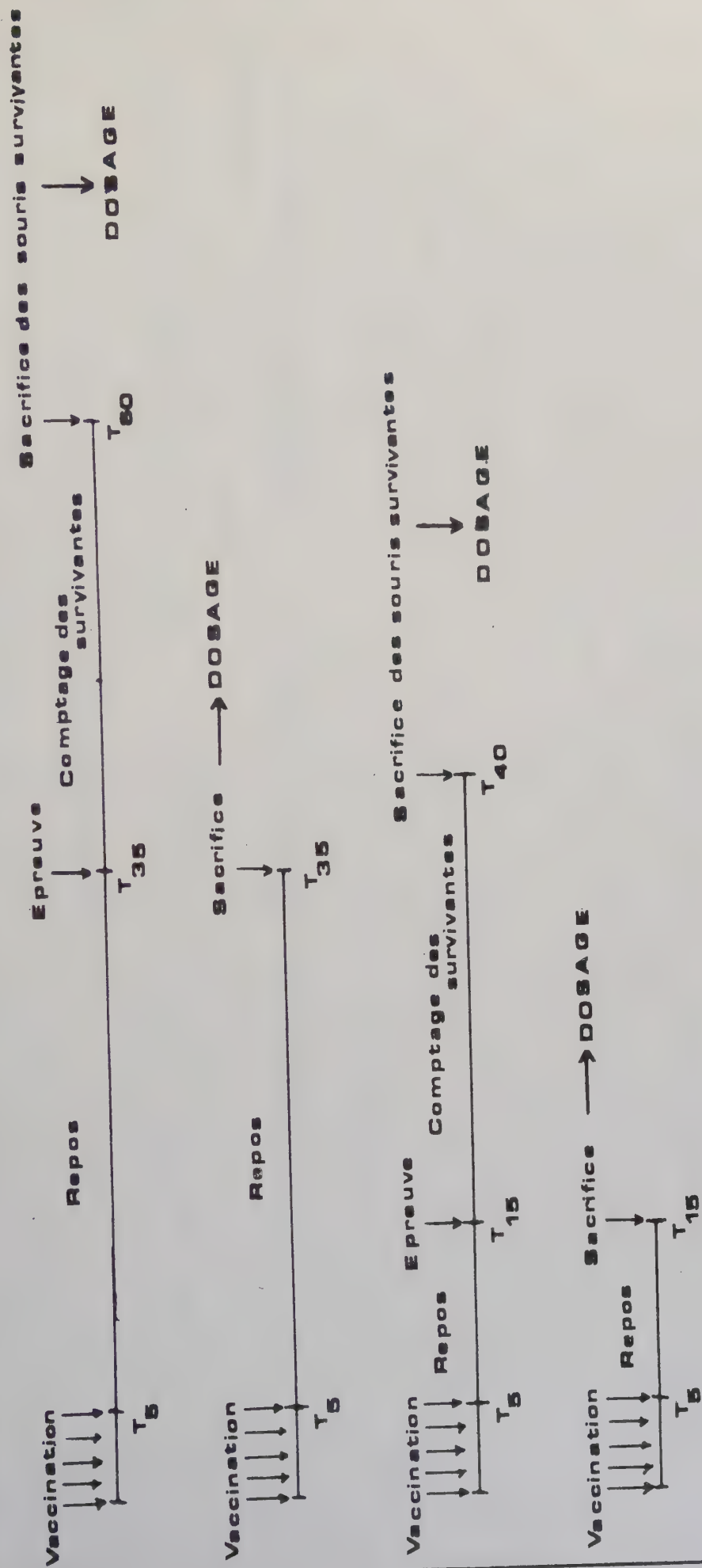
MATERIEL et METHODES

1) Animaux

Nous avons utilisé pour cette étude des souris Balb/c pesant entre 18 et 20 g. Les animaux vaccinés ont reçu quotidiennement, pendant cinq jours consécutifs, soit le vaccin inactivé, soit le vaccin vivant, à la dose de 1×10^7 bactéries par souris. Au dixième (t. 15) ou au trentième jour (t. 35) qui a suivi la dernière vaccination, une partie des animaux de chaque lot a été éprouvée par une dose de bactéries pathogènes (S.typhimurium C5S) pour contrôler l'efficacité du vaccin, l'autre partie a été sacrifiée, après un jeûne de 24 heures, pour le dosage des immunoglobulines.

Ces dosages ont été pratiqués en parallèle sur des lots témoins de souris non vaccinées ainsi que sur les animaux ayant survécu à la dose d'épreuve.

Les figures 11 et 12 résument le protocole suivi, tandis que la figure 13 donne la désignation des différents lots d'animaux utilisés.



PROTOCOLE DE VACCINATION UTILISÉ POUR L'ÉTUDE DE L'ÉVOLUTION DU
TAUX DES IMMUNOGLOBULINES SÉCRÉTOIRES INTÉSTINALES.

FIGURE 11

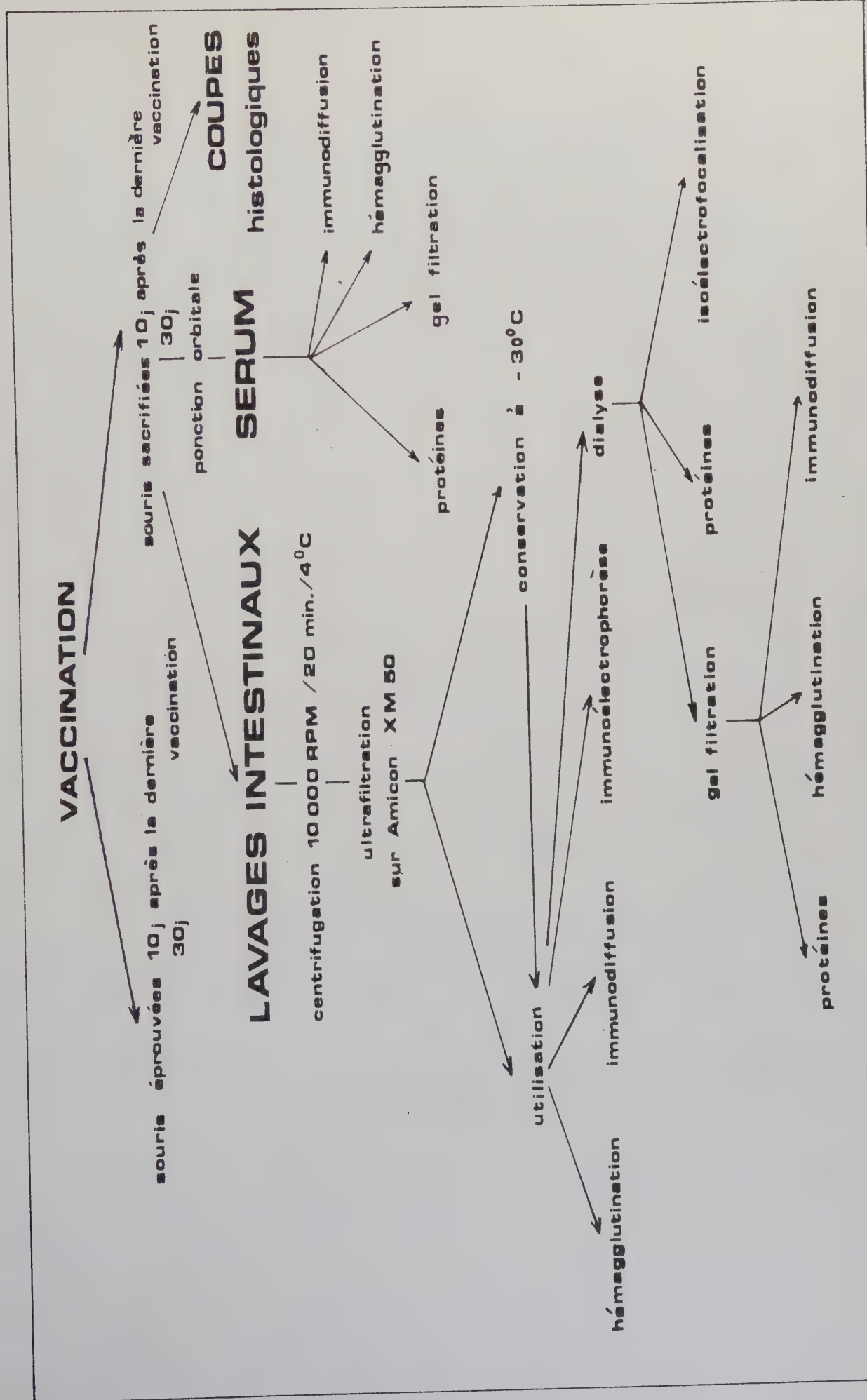


FIGURE 12 : Organigramme de l'étude de l'évolution des immunoglobulines après vaccination par voie orale

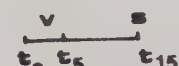
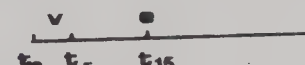
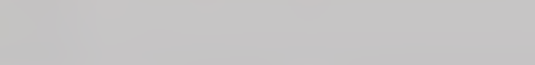
LOTS *	PROTOCOLE EXPERIMENTAL v: Vaccination ●: épreuve t: temps en jours s: sacrifice
I	 témoin
II	 C ₅
III	
IV	 M206
V	
VI	 M206
VII	

FIGURE 13 :
DÉSIGNATION DES LOTS EN FONCTION
DU PROTOCOLE SUIVI.

* Chaque lot est constitué de 60 animaux.

2) Prélèvements

a) Sérum :

Les prélèvements de sang ont été effectués par ponction du sinus orbitaire des souris préalablement anesthésiées à l'éther. Après coagulation, les sérums ont été séparés par décantation, centrifugés, puis conservés en ampoules scellées à -30°C .

b) Sécrétions intestinales :

Après ponction orbitaire, chaque animal a été sacrifié de façon à lui prélever séparément l'intestin grêle et le colon. Ces organes ont été ensuite rincés à l'aide d'une solution aqueuse à 9 p.100 de chlorure de sodium et 1 p.100 d'azide sodium, contenue dans une pissette dont l'extrémité effilée était introduite dans l'intestin. On a ainsi recueilli pour chaque animal 25 ml de liquide de lavage intestinal dans un tube à essai refroidi dans de la glace pilée.

Ces liquides de lavage ont été regroupés en lots de soixante (les lots de dix puis de trente utilisés au début se sont révélés insuffisants) et centrifugés à 10.000 tours/minute, pendant 20 minutes, à $+ 4^{\circ}\text{C}$ (centrifugeuse Beckman J-21 B). Les surnageants recueillis, correspondant à un volume de 1.500 ml environ, ont été ramenés à 15 ml par ultracentrifugation sur membranes Amicon XM 50 qui ne retiennent que les protéines de poids moléculaire supérieur à 50.000. Toutes ces opérations ont été effectuées dans une chambre froide à $+ 2^{\circ}\text{C}$. Les liquides obtenus, de teinte plus ou moins foncée, ont été répartis dans plusieurs tubes bouchés hermétiquement et conservés à -30°C ou utilisés immédiatement.

3) Dosage des protéines

Des dosages de protéines ont été pratiqués sur les sérums, les liquides de lavages intestinaux et sur les fractions obtenues par analyse chromatographique de ces échantillons. Nous avons utilisé pour cela la méthode de LOWRY adaptée à l'Auto-analyzer Technicon par CASTAIGNE (90). Il s'agit d'une réaction colorée spécifique des acides aminés aromatiques contenus dans les protéines, qui se développe en deux étapes : -réaction de la protéine avec le cuivre en milieu alcalin,

-réduction du réactif phosphomolybdique-phosphotungstique de FOLIN par la protéine ainsi traitée. La coloration bleue obtenue est mesurée à 650 nm.

Les réactifs employés étaient les suivants :

- réactif de FOLIN-CIOCALTEU du phénol (Produit Merck n° 9001), dilué au tiers avec de l'eau distillée au moment de l'emploi,

- réactif cuprique :

Cu SO ₄ , 5 H ₂ O	1 g
Tartrate de sodium	2 g
H ₂ O distillées ... q.s.p.	1000 ml

- réactif alcalin :

Na OH 10 N	40 ml
Na ₂ CO ₃	42,4 g
H ₂ O distillée ... q.s.p.	2000 ml

Le schéma de montage des tubes de pompe est donné par la figure 13.

Chaque série de dosages comportait une gamme étalon de sérum-albumine bovine (produit NBC) à des concentrations variant de 10 à 180 µg.

4) Alalyse chromatographique

Des parties aliquotes des sérums et des liquides de lavages intestinaux ont été analysées par chromatographie d'exclusion sur colonne. Pour cela les échantillons ont été dialysés pendant 48 h à + 4°C contre un tampon phosphate 0,1 M de pH 7,4 (Na H₂ PO₄, H₂O : 2,62 g, Na₂H PO₄, 12 H₂O : 29,01 g, eau distillée q.s.p. 1000 ml) puis déposés sur les colonnes après contrôle de leur teneur en protéines.

Nous avons utilisé comparativement deux types de gels, le Sephadex G-200 (produit Pharmacia), xérogel de dextranes dont le domaine de fractionnement s'étend de 5.000 à 800.000 daltons pour les protéines globulaires et l'Indubiose AcA22 (produit IBF, commercialisé par LKB sous le nom d'Ultrogel AcA2,2), gel hydraté mixte de polyacrylamide et d'agarose dont le domaine de fractionnement va de 90.000 à 1.200.000 daltons pour les protéines globulaires.

Les modalités opératoires ont été les suivantes :

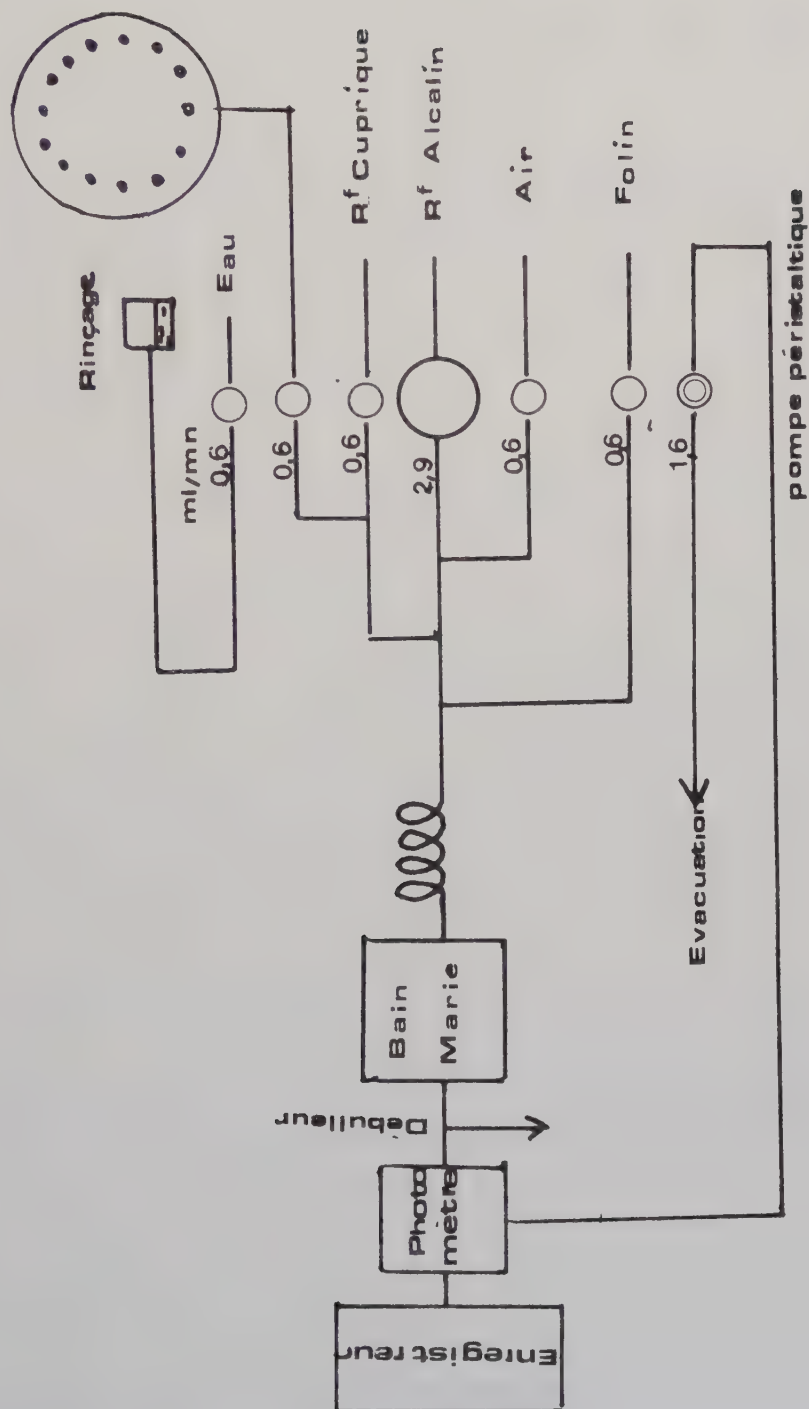


Figure 14 Schéma de montage du technicon pour le dosage des protéines selon la méthode de Lowry adaptée à l'autoanalyseur par CASTAIGNE (90).

a) Préparation des gels :

- Séphadex G-200 : 26 g de xérogel ont été mis en suspension dans 1000 ml d'eau distillée et placés à + 4°C pendant 3 jours pour hydratation et gonflement. Après séparation des particules fines par décantation, le gel a été repris dans du tampon phosphate 0,1 M de pH 7,4 et dégazé sous vide, à la température du laboratoire pendant 24 heures.
- Indubiose AcA 22 : 500 ml de gel prêt à l'emploi ont été repris dans du tampon phosphate 0,1 M de pH 7,4 et dégazés sous vide, à la température du laboratoire pendant 24 heures.

b) Remplissage des colonnes :

Nous avons utilisé des colonnes Séphadex K 25/100 placées dans une enceinte réfrigérée à + 4°C. Dans chaque colonne, munie de son réservoir de remplissage R 25, on a introduit du tampon jusqu'au tiers de la hauteur. Après avoir chassé l'air de la tubulure de sortie et réglé la hauteur de cette dernière de manière à éviter toute surpression, on a rempli la colonne de gel jusqu'à ce que la hauteur en fin de sédimentation atteigne 90 cm environ, puis on a stabilisé le gel en y faisant passer 4 volumes de tampon à partir d'un vase de Mariotte dont la hauteur était réglée de manière à avoir une pression hydrostatique égale à 10 cm d'eau pour le Séphadex et 20 cm pour l'Indubiose.

c) Dépôt des échantillons :

Chaque échantillon (4 ml de solution contenant environ 30 mg de protéines totales) a été déposé sur la colonne à l'aide d'un cylindre applicateur qu'on a retiré lorsque le chargement était terminé.

d) Elution :

L'élution a été effectuée par gravité, sous pression constante, réglée à l'aide d'un vase de Mariotte. Le débit du tampon était en moyenne de 8 ml/heure. Des fractions de 130 gouttes (4 ml environ) ont été recueillies sur collecteur GILSON Microco. La sortie des protéines dans l'éluat a été contrôlée simultanément par mesure de l'absorption à 280 mμ sur spectrophotomètre UVICORD II LKB ou sur UA-5 ISCO et par dosage colorimétrique sur Autoanalyzer TECHNICON. Chacune des fractions séparées a été ensuite identifiée grâce à ses propriétés électrophorétiques et immunologiques.

5) Analyse électrophorétique

a) Electrophorèse :

Nous avons utilisé des bandes d'acétate de cellulose Cellogel SEBIA de 14x5,7 cm en tampon Tris-véronal-véronal sodique 0,05 M de pH 8,8 (Tris : 7,20 g, véronal : 1,84 g, véronal sodique: 10,30 g, eau distillée q.s.p. 1000 ml). L'échantillon à analyser (1,5 µl) a été déposé sur la bande préalablement trempée dans le tampon pendant 15 minutes, puis soumis à une migration électrophorétique, pendant 30 minutes, dans un courant constant de 200 volts, l'intensité étant de 5 m A. Chaque bande a été ensuite colorée dans une solution aqueuse à 0,5 p.100 de Ponceau S et 5 p.100 d'acide trichloracétique, décolorée à l'aide d'une solution aqueuse d'acide acétique à 5 p.100 puis rendue transparente par trempage dans le mélange méthanol-acide acétique diacétonalcool 75 : 20 : 5 v/v. Les pourcentages relatifs des protéines ont été déterminés à l'aide d'un densitomètre intégrateur Cellomatic (C.G.A. SEBIA).

b) Immunoélectrophorèse :

Les analyses immunoélectrophorétiques ont été pratiquées sur des plaques de matière plastique transparente de 10 x 8,5 cm recouvertes d'une pellicule sèche d'Agar où les puits pour les dépôts des échantillons et les rigoles destinées à recevoir les immunosérums sont déjà évidés (Immunoflim SEBIA).

Les plaques ont été d'abord immergées dans de l'eau distillée pendant 30 minutes, puis dans le tampon de migration pendant 15 minutes (tampon Tris-véronal 0,05 M de pH 8,8 identique à celui qui a été utilisé pour l'électrophorèse). Après aspiration, à l'aide de papier filtre, de l'excès de liquide demeuré dans les rigoles, les échantillons à analyser ont été déposés dans les puits sous un volume de 3 µl, puis soumis à l'action d'un champ électrique de 120 volts pendant 60 minutes.

Après la migration, 80 µl d'immunosérum ont été déposés dans chaque rigole et on a laissé la diffusion s'effectuer en chambre humide pendant 24 heures. La mise en évidence des arcs de précipitation a été faite de la même manière que pour les immunodiffusions.

6) Immunodiffusion

a) Immunodiffusion double :

Nous avons utilisé la technique de double diffusion en gélose d'OUCHTERLONY (298) modifiée en microméthode sur lame porte-objet par SHEIDEGGER (366). Toutes les séparations ont été réalisées sur matériel GELMAN. Des séries de six lames de 76 x 26 cm groupées sur un portoir métallique ont été enduites, à l'aide d'un pinceau, d'un film adhésif constitué de :

- Glycérine 2 gouttes
- Agar 0,1 g
- Azide de sodium 0,1 g
- Eau distillée q.s.p. 100 ml,

séchées au four à 80°C, puis recouverte de 3 ml d'une solution de gélose, préalablement liquéfiée au bain-marie, de composition suivante :

- Agar noble purifié Difco... 1 g
- Chlorure de sodium 1 g
- Azide sodium 0,1 g
- Eau distillée q.s.p. 100 ml.

Après solidification de la gélose à la température du laboratoire, les lames ont été conservées en chambre humide. Des trous de 3 mm de diamètre ont été percés dans le gel à l'aide d'un emporte-pièce, au moment de l'emploi, et remplis soit d'antigène soit d'immunsérum. La diffusion s'est effectuée pendant 3 à 5 jours en chambre humide.

Les gels ont été ensuite soumis à deux lavages de 24 heures chacun dans une solution de NaCl à 1 p.100, pour éliminer les protéines non précipitées, puis rincés à l'eau distillée pendant 6 heures et séchés après avoir été recouverts d'une bande de papier filtre humide. La coloration des lames a été effectuée en 5 minutes à l'aide d'une solution à 1 p.1000 d'Amidoschwartz dans le mélange méthanol-acide acétique-eau 45 : 10 : 45 (v/v). Celles-ci ont été ensuite soumises à cinq lavages successifs de 10 minutes chacun dans le même solvant.

Pour une partie des analyses antigéniques nous avons utilisé les plaques de verre et le matériel LKB, en suivant le protocole décrit par BENNICH et KARLSSON (40). Les réactifs étaient les mêmes que précédemment.

b) Immunodiffusion radiale :

Pour le dosage spécifique des différentes classes d'immunoglobulines, nous avons eu recours à la technique d'immunodiffusion quantitative de MANCINI (256) qui consiste à faire diffuser radialement les antigènes dans un gel d'agar à 1 p.100 tamponné à pH 8,6 et contenant l'anticorps monospécifique. Il se forme un complexe antigène-anticorps qui s'immobilise progressivement dans le gel. Il en résulte un épuisement progressif de l'anticorps contenu dans le gel autour du puits, jusqu'à consommation totale de l'antigène déposé. L'image finale obtenue au bout de 48 à 72 heures est un anneau de précipitation dont le diamètre est proportionnel à la quantité d'antigène présente dans la prise d'essai. En déposant à chaque fois le même volume d'échantillon on peut donc y doser les immunoglobulines à condition d'établir une courbe d'étalonnage à l'aide d'une solution d'antigène de concentration connue. La précision obtenue est de l'ordre de 5 p.100.

Nous avons utilisé des plaques anti Ig₁, anti IgG₂, anti IgA et anti IgM de souris (plaques Meloy J-301, J-302, J-303 et J-304 de 8,5 x 6,8 cm percées de 24 puits de 2,5 mm de diamètre). Le volume des dépôts était de 5 µl, la durée de diffusion de 18 heures. L'étalonnage a été effectué à l'aide d'un sérum de référence (Mouse immunoglobulin référence standard J 401 de Meloy).

7) Isoelectrofocalisation

Nous avons essayé de fractionner les immunoglobulines intestinales et sériques en fonction de leur pH, en faisant appel à la technique d'isoélectrofocalisation sur colonne. Nous avons utilisé pour cela une colonne LKB 8 100 de 110 ml, les conditions opératoires étant les suivantes :

Ampholytes : Solution à 40 p.100 d'ampholine LKB pH 3,5-10.

Polarité : - Anode (+) en fond de colonne
- Cathode (-) en haut de colonne.

Solutions d'électrolytes :

- Anode (+) :	Saccharose	15 g
	H ₃ PO ₄ N	4 ml
	H ₂ O q.s.p. ...	25 ml
- Cathode (-):	Na OH 0,25 N..	10 ml

b) Préparation du lipopolysaccharide activé :

Une quantité de 100 mg de lipopolysaccharide extrait de Salmonella typhimurium M 206 par le procédé phénol-eau à froid (cf. figure 7) a été dissoute dans 6 ml de Na OH 0,25 N et chauffée pendant 1 heure à 56°C. La solution qui était opalescente au départ est devenue claire et visqueuse puis a perdu cette viscosité tandis qu'il s'est formé un précipité.

Le précipité a été séparé par centrifugation à 0°C. Le surnageant a été neutralisé par l'acide acétique, additionné de 3 volumes d'éthanol à 95°. On a ainsi obtenu, après un séjour de 24 h en chambre froide, un nouveau précipité qui a été lavé deux fois à l'éthanol, repris dans de l'eau distillée puis lyophilisé. La quantité de produit sec obtenue était de 75 mg environ.

c) Préparation des hématies tannées :

A 0,2 ml de culot de globules rouges de mouton, préalablement lavés dans une solution aqueuse de NaCl 0,15 M, on a ajouté 7,8 ml de tampon phosphate 0,15 M de pH 7,2. Cette suspension a été additionnée de 8 ml de solution de tanin, laissée 10 minutes à la température ambiante puis centrifugée à 1 500 tours/minute pendant 10 minutes. Après centrifugation, le culot a été lavé dans 8 ml de solution tampon isotonique de pH 7,2, puis remis en suspension dans 8 ml de solution aqueuse de NaCl 0,15 M.

d) Sensibilisation des hématies :

Les hématies tannées ont été lavées deux fois dans la solution de NaCl 0,15 M, puis reprises dans 8 ml de tampon de pH 6,4 contenant 0,5 mg de LPS activé par ml. Après un contact de 30 minutes à 37°C, les hématies sensibilisées ont été séparées par centrifugation puis lavées deux fois dans la solution de NaCl 0,15 M, puis remises en solution dans 8 ml de ce soluté.

e) Réactions d'hémagglutination :

Les hémagglutinations ont été effectuées sur des plaques en plastique contenant 8 rangées de 12 godets coniques d'un volume de 0,3 ml (Disposo-Trays IS-MVC-96). On dispose dans chaque godet 0,05 ml de sérum de lapin normal (NRS) dilué au centième. Les sérums ou sécrétions intestinales à titrer ont été dilués dans ces 0,05 ml de NRS jusqu'à la dilution 1/4096 puis on a ajouté dans chaque godet 0,05 ml de suspension d'hématies tannées sensibilisées. La lecture a été effectuée après 2 heures de contact.

9) Contrôles histologiques

Les contrôles histologiques ont été pratiqués par immunofluorescence selon la méthode indirecte, sur des coupes en congélation.

a) Prélèvements intestinaux :

Les prélèvements histologiques ont été effectués sur des souris témoins, sur un lot de souris sacrifiées 10 jours après la dernière vaccination et sur un lot sacrifié 30 jours après la vaccination. Des fragments d'intestins d'une longueur de 3 mm ont été prélevés, congelés dans un bain d'isopentane préalablement refroidi à la température de l'azote liquide, puis stockés à -70°C . Des coupes de $7\ \mu$ d'épaisseur environ ont été exécutées au cryostat, recueillies sur des lames porte-objet fixées 5 minutes à l'alcool à 95° , puis lavées au tampon véronal 0,1 M de pH 8,6.

b) Réaction immunologique :

Les coupes ont été mises en contact pendant 30 minutes avec un sérum de chèvre anti IgA de souris, soumises à trois rinçages de 15 minutes dans un tampon P.B.S. *, puis remises en contact pendant 30 minutes avec un sérum de lapin anti chèvre conjugué à l'isothiocyanate de fluorescéine (Institut Pasteur) préalablement adsorbé sur poudre de foie de cobaye. On les a finalement lavées pendant 15 minutes dans le tampon P.B.S.

c) Coloration des coupes :

Les coupes ont été colorées au bleu Evans (solution 1/10 000), lavées au tampon véronal de pH 7,3 et montées à la glycérine tamponnée de pH 8,6 (glycérine bidistillée - tampon P.B.S. 9 : 1 v/v).

Les observations ont été faites sur un microscope LEITZ Ortholux équipé pour la fluorescence (lampe HBO 200), en utilisant des filtres d'excitation BG 12 et un filtre d'arrêt K 530.

On a considéré comme réponse positive l'apparition d'une fluorescence verte sur fond rouge et comme réponse négative l'absence de fluorescence spécifique.

* Tampon P.B.S. (Phosphate buffered saline)	
Na Cl	7,650 g
Na ₂ H PO ₄	0,724 g
KH ₂ PO ₄	0,210 g
Eau distillée q.s.p.	1000 ml.

RESULTATS

1°) DOSAGE DES PROTEINES

Les résultats des dosages de protéines effectués sur les différents lots de sérums et de lavages intestinaux sont groupés dans les tableaux XXIII et XXIV. Nous rappelons qu'il s'agit pour les sérums de protéines totales et pour les lavages intestinaux de protéines de poids moléculaire supérieur à 50.000 daltons

On peut noter que les chiffres obtenus pour les sérums (50 mg/ml en moyenne) sont en accord avec les valeurs habituellement observées pour la souris.

2°) FRACTIONNEMENT DES IMMUNOGLOBULINES SERIQUES ET INTESTINALES PAR CHROMATOGRAPHIE D'EXCLUSION

a) Choix du gel :

Pour séparer les immunoglobulines par chromatographie d'exclusion, il nous fallait utiliser un gel dont le domaine de fractionnement s'étend de 160.000 à 390.000. Nous avons essayé comparativement le Séphadex G-200 et l'Indubiose AcA-2.2.

La figure 15 donne les profils d'élution obtenus à partir d'un même échantillon de liquide de lavage intestinal. Il apparaît que le pouvoir de résolution du Séphadex G-200 est inférieur à celui de l'Indubiose AcA-2.2. Nous n'avons donc retenu que ce dernier pour les essais ultérieurs.

b) Résultats obtenus avec les liquides de lavages intestinaux :

Les figures 16 et 17 donnent les profils d'élutions obtenus pour les liquides de lavages intestinaux. On constate que la séparation des pics est insuffisante pour permettre de localiser exactement la position des différentes classes d'immunoglobulines et d'évaluer le taux de ces dernières par simple planimétrie. C'est pourquoi

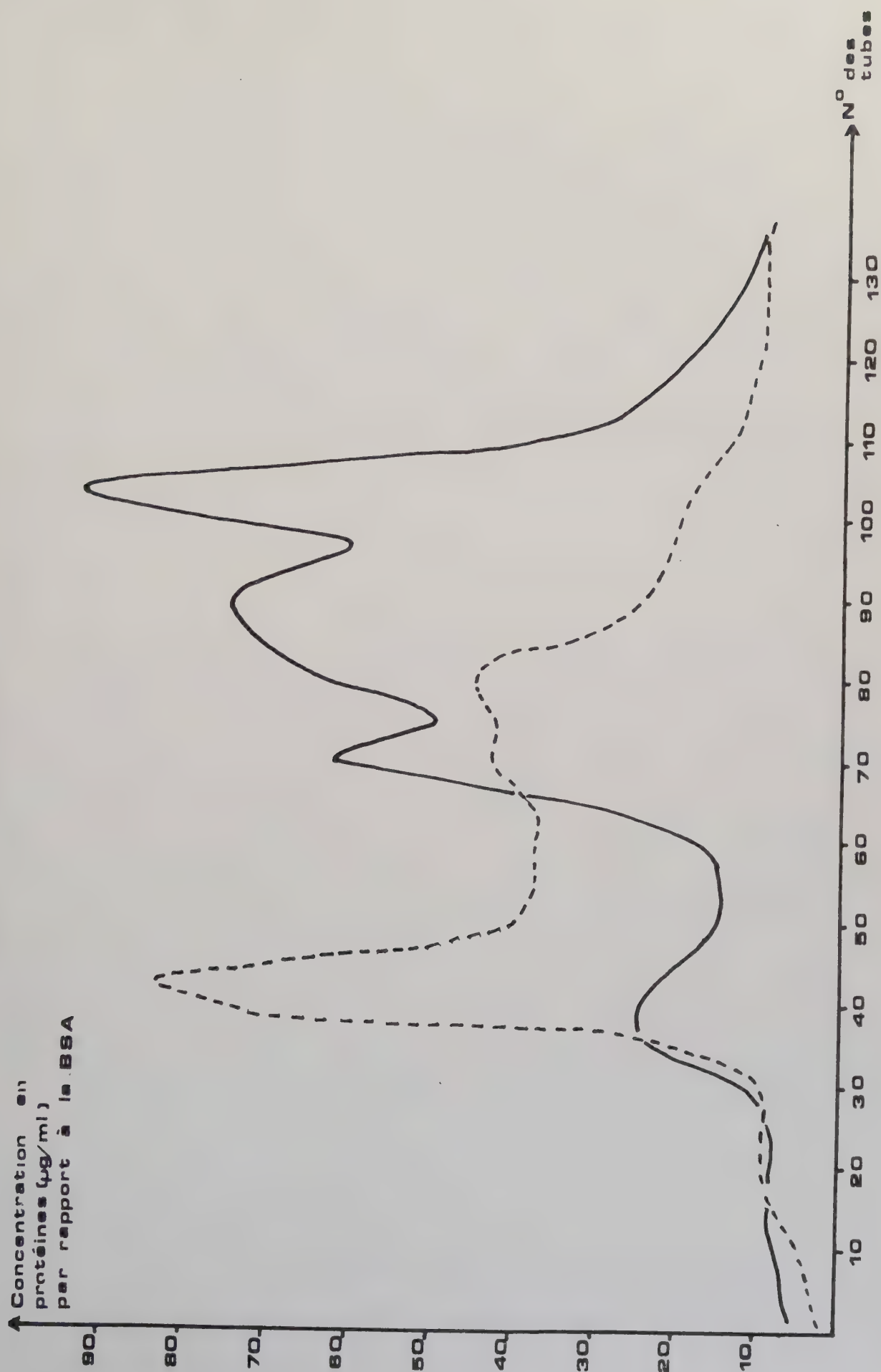


FIGURE 15

COMPARAISON DES PROFILS D'ÉLUTION D'UN LAVAGE INTÉSTINAL
SUR COLONNE G200 (---)

- INDUBIOSE Aca 2-2 (—)

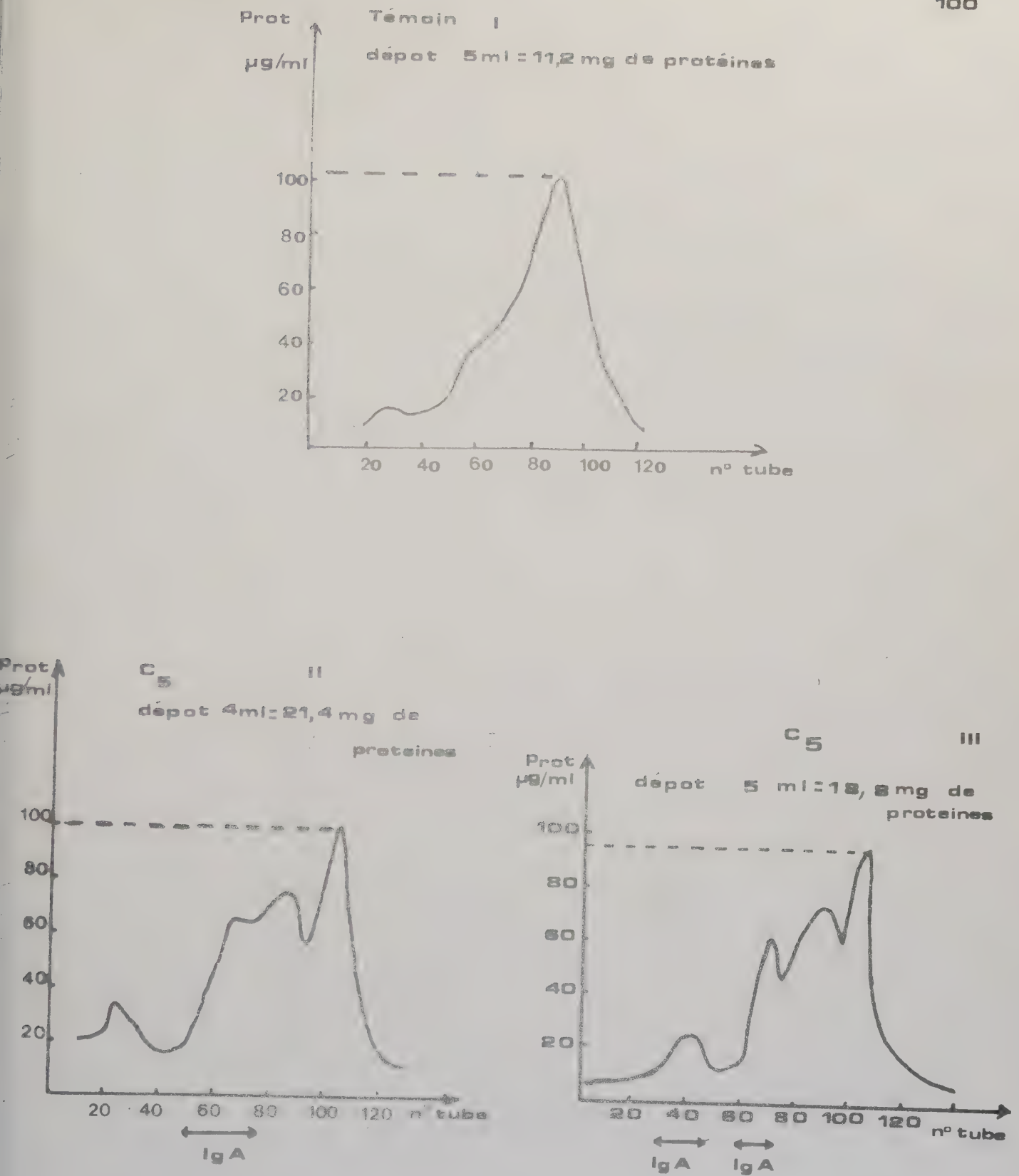


FIGURE 16

DIAGRAMMES D'ELUTION DES DIFFERENTS

LAVAGES INTESTINAUX A PARTIR DE GEL D'INDUSIOSE A_CA 2-2.

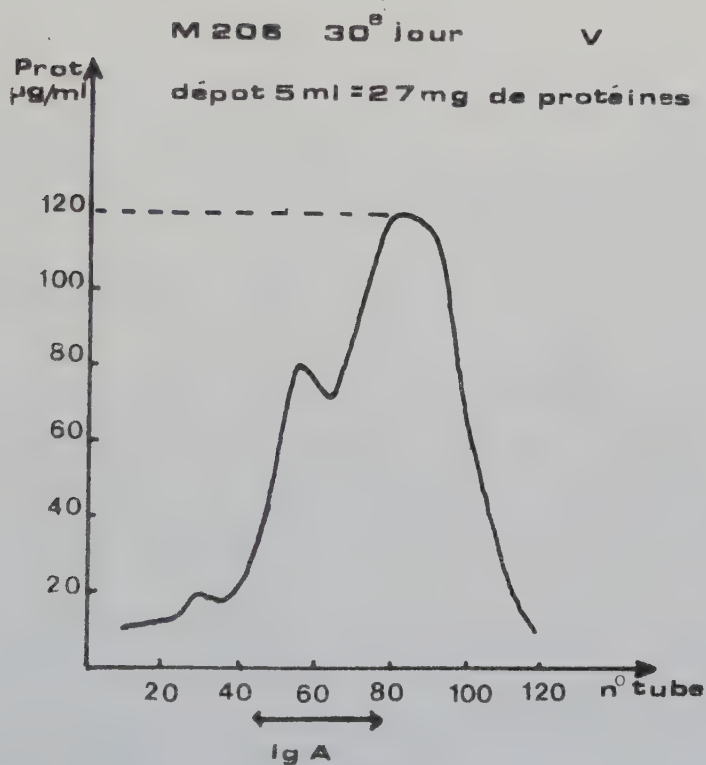
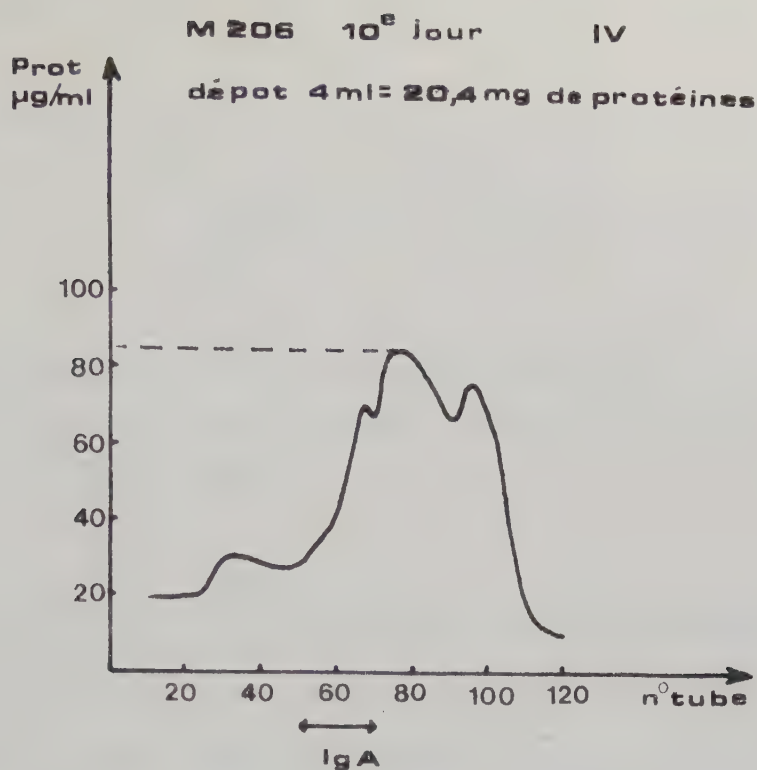


FIGURE 17

DIAGRAMMES D'ÉLUTION DES DIFFÉRENTS
LAVAGES INTESTINAUX A PARTIR DE GEL D'INDUBIOSE
AcA 2-2 .

nous avons concentré les fractions principales sur ultrafiltres Amicon XM 50 pour y rechercher spécifiquement les IgA, les IgM, les IgG₁ et les IgG₂ et doser les anticorps correspondant à l'antigène O (lipopolysaccharide). Les résultats observés sont notés dans le tableau XXIII.

On remarque que les taux d'anticorps anti O demeurent très faibles au niveau intestinal. Seuls les animaux vaccinés à l'aide de la bactérie vivante présentent une augmentation significative de ces anticorps vers le trentième jour qui suit la vaccination.

Cette activité anticorps n'apparaît que très faiblement dans les fractions séparées par chromatographie, probablement à cause de la dilution des échantillons.

L'immunodiffusion double n'a permis de détecter que des IgA. Celles-ci apparaissent dans les tubes situés entre 50 et 70, ce qui correspond à un volume d'élution compris entre 200 ml et 280 ml.

Dans le cas particulier du lot III nous avons obtenu aussi une réponse en IgA au niveau des tubes 30 à 50, c'est-à-dire dans la fraction exclue du gel. On peut donc penser qu'il s'agit d'une forme polymérisée de ces immunoglobulines.

c) Résultats obtenus avec les sérums :

Les figures 18, 19 donnent les profils d'élution obtenus dans le cas des sérums. Les essais de localisation des différentes classes d'immunoglobulines dans les fractions séparées montrent que les IgG₁ et les IgG₂ sortent de la colonne entre les tubes 72 et 95 ce qui correspond à un volume d'élution compris entre 288 ml et 380 ml.

En ce qui concerne les IgA et les IgM on peut noter que ces immunoglobulines sont présentes, en faible quantité, dans les sérums des lots II, III, et V, mais ne se retrouvent pas dans les fractions séparées par chromatographie, probablement à cause de la dilution de ces dernières.

Il existe cependant une exception pour le lot III dont la fraction élue entre les tubes 62 à 72 contient des IgA.

Les résultats obtenus montrent que la chromatographie d'exclusion ne permet pas de doser directement les immunoglobulines.

LOTS	Fraction étudiée*	Protéines totales après concentration (µg/ml)	Hémagglutination (anti O)	IMMUNODIFFUSION			
				IgA	IgM	IgG ₁	IgG ₂
I TÉMOIN	totum	2240	—	+	—	—	—
	20-30	280	—	—	—	—	—
	45-55	220	—	—	—	—	—
	56-70	320	—	—	—	—	—
	71-90	640	—	—	—	—	—
II VACCINÉ C ₅ T35	totum	5360	1/64	++	—	—	—
	25-35	200	—	—	—	—	—
	50-75	340	—	++	—	—	—
	76-90	880	—	—	—	—	—
	91-110	800	—	—	—	—	—
III VACCINÉ C ₅ survivants T60	totum	3760	1/2	++++	—	—	—
	30-50	230	—	++	—	—	—
	60-75	360	—	++	—	—	—
	76-95	830	—	—	—	—	—
	96-110	820	—	—	—	—	—
IV VACCINÉ M206 T15	totum	5120	1/64	++	—	—	—
	20-40	280	1/2	—	—	—	—
	41-50	80	—	—	—	—	—
	51-60	380	—	++	—	—	—
	61-70	720	—	++	—	—	—
	71-90	960	1/2	+	—	—	—
	91-110	760	—	—	—	—	—
V VACCINÉ M206 T35	totum	5480	1/256	++++	—	—	—
	20-40	160	1/4	—	—	—	—
	50-65	560	1/2	+++	—	—	—
	66-80	800	1/2	+++	—	—	—
	81-100	1000	1/2	—	—	—	—

* Numéro des tubes contenant chacun un volume de 4ml d'éluat.

TABLEAU XXIII

DOSAGE DES PROTÉINES ET RECHERCHE QUALITATIVE DES IMMUNOGLOBULINES DANS LES TOTUMS ET LES ÉLUATS DE CHROMATOGRAPHIE DES LAVAGES INTESTINAUX.

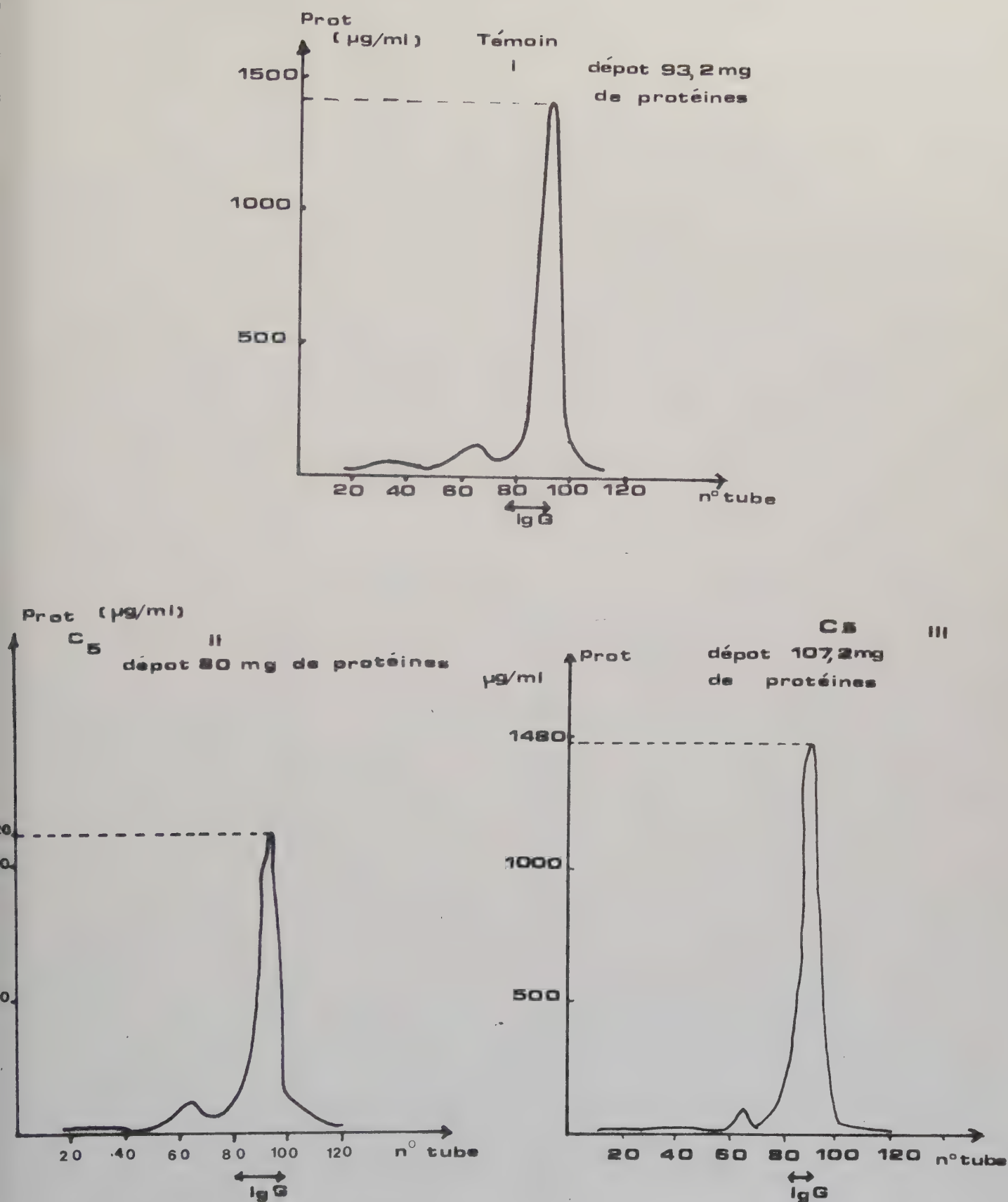


Figure 18

DIAGRAMMES D'ÉLUTION DES DIFFÉRENTS
 SÉRUMS A PARTIR DE GEL D'INDUBIOSE A_CA 2-2.

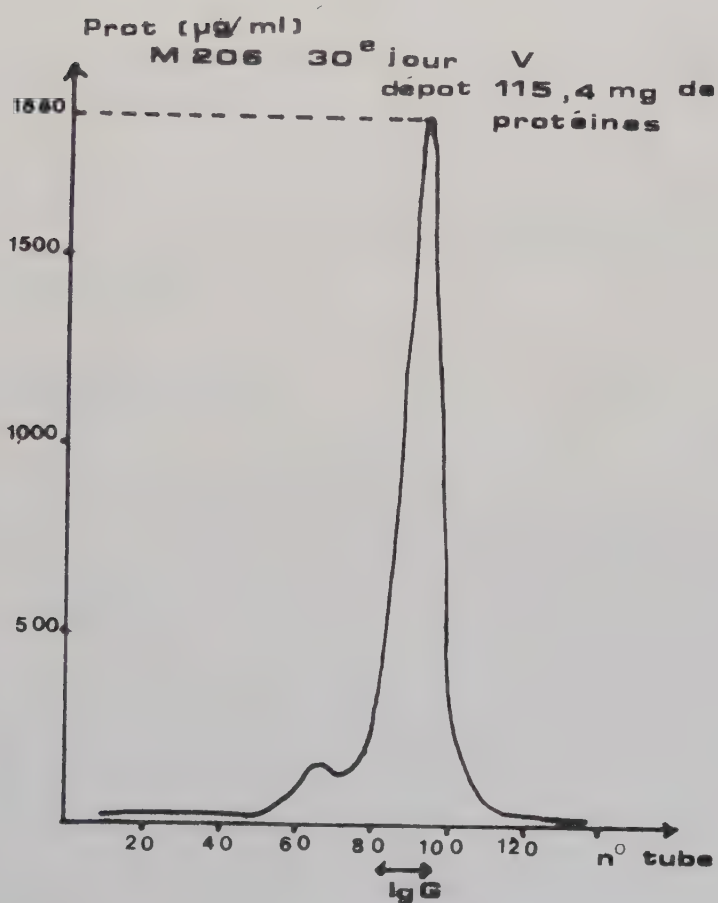
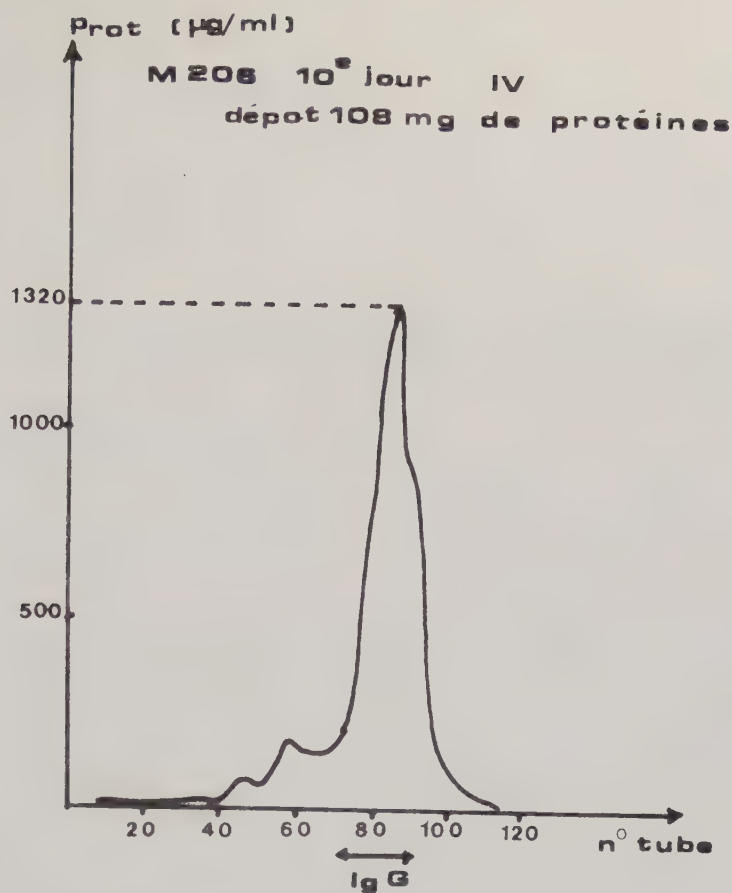


FIGURE 19

DIAGRAMME D'ÉLUTION DES DIFFÉRENTS
SÉRUMS A PARTIR DE GEL D'INDUBIOSE Aca 2-2

Les taux d'anticorps anti O évalués par hémagglutination sont très élevés dans tous les lots de sérums.

Les résultats observés sont notés dans le tableau XXIV.

3°) ANALYSE ELECTROPHORETIQUE

a) Electrophorèse :

Il est bien connu que l'électrophorèse simple ne sépare pas les différentes classes d'immunoglobulines, celles-ci se trouvant réunies dans la zone des γ globulines. Nous avons cependant cherché à savoir si cette méthode permettait de mettre en évidence une augmentation du taux des immunoglobulines chez les animaux vaccinés.

La figure 20 montre que les variations résultant de la vaccination n'apparaissent pas de manière significative sur les profils électrophorétiques des sérums. On peut noter cependant une légère diminution du rapport $\frac{\text{albumines}}{\text{globulines}}$ dans le cas des sérums des animaux vaccinés.

En ce qui concerne les liquides de lavages intestinaux, nous n'avons obtenu aucune migration décelable, probablement à cause de la trop faible concentration en protéines des échantillons.

b) Immunoélectrophorèse :

L'électrophorèse simple ne permettant pas de séparer les différentes immunoglobulines, nous avons fait appel à l'immunoélectrophorèse pour la mise en évidence des IgM, des IgA, des IgG₁ et des IgG₂, dans les sérums et les liquides de lavages intestinaux provenant d'animaux vaccinés et d'animaux témoins non vaccinés.

La figure 21 montre que les sérums témoins et les sérums d'animaux vaccinés donnent des arcs de précipitation caractéristiques de chaque classe d'immunoglobulines, sans qu'on puisse observer des différences sur le plan quantitatif.

En revanche, aucun des liquides de lavages intestinaux n'a répondu positivement à la recherche des immunoglobulines.

LOTS	Fraction étudiée	Protéines totales (µg/ml)	Hémagglu- tination (anti O)	IMMUNODIFFUSION			
				Ig A	Ig M	Ig G ₁	Ig G ₂
I TÉMOIN	totum	44 400	—	—	—	+++	+
	20- 45	180	—	—	—	—	—
	46- 73	800	—	—	—	—	—
	74- 95	2120	—	—	—	+++	++
II VACCINÉ C ₅ T 35	totum	40000	1/1024	+	+	++++	+++
	20- 45	240	—	—	—	—	—
	46- 75	640	—	—	—	—	—
	76-100	3760	—	—	—	+++	++
III VACCINÉ C ₅ survivantes T 60	totum	53600	1/8192	++	++	++++	++
	62- 72	80	—	++	—	—	—
	80- 95	280	—	—	—	+++	+
IV VACCINÉ M 206 T 15	totum	72000	1/1024	—	—	++++	++
	40- 52	80	—	—	—	—	—
	53- 70	480	—	—	—	—	—
	71- 90	920	1/2	—	—	++++	+++
V VACCINÉ M 206 T 35	totum	44400	1/2048	++	+	++++	+++
	50- 70	680	—	—	—	—	—
	71- 82	500	—	—	—	—	++
	83- 100	5360	—	—	—	++++	+++

TABEAU XXIV
DOSAGE DES PROTEINES ET RECHERCHE
QUALITATIVE DES IMMUNOGLOBULINES SÉRIQUES DANS
LES TOTUMS ET LES ÉLUATS DE CHROMATOGRAPHIE.

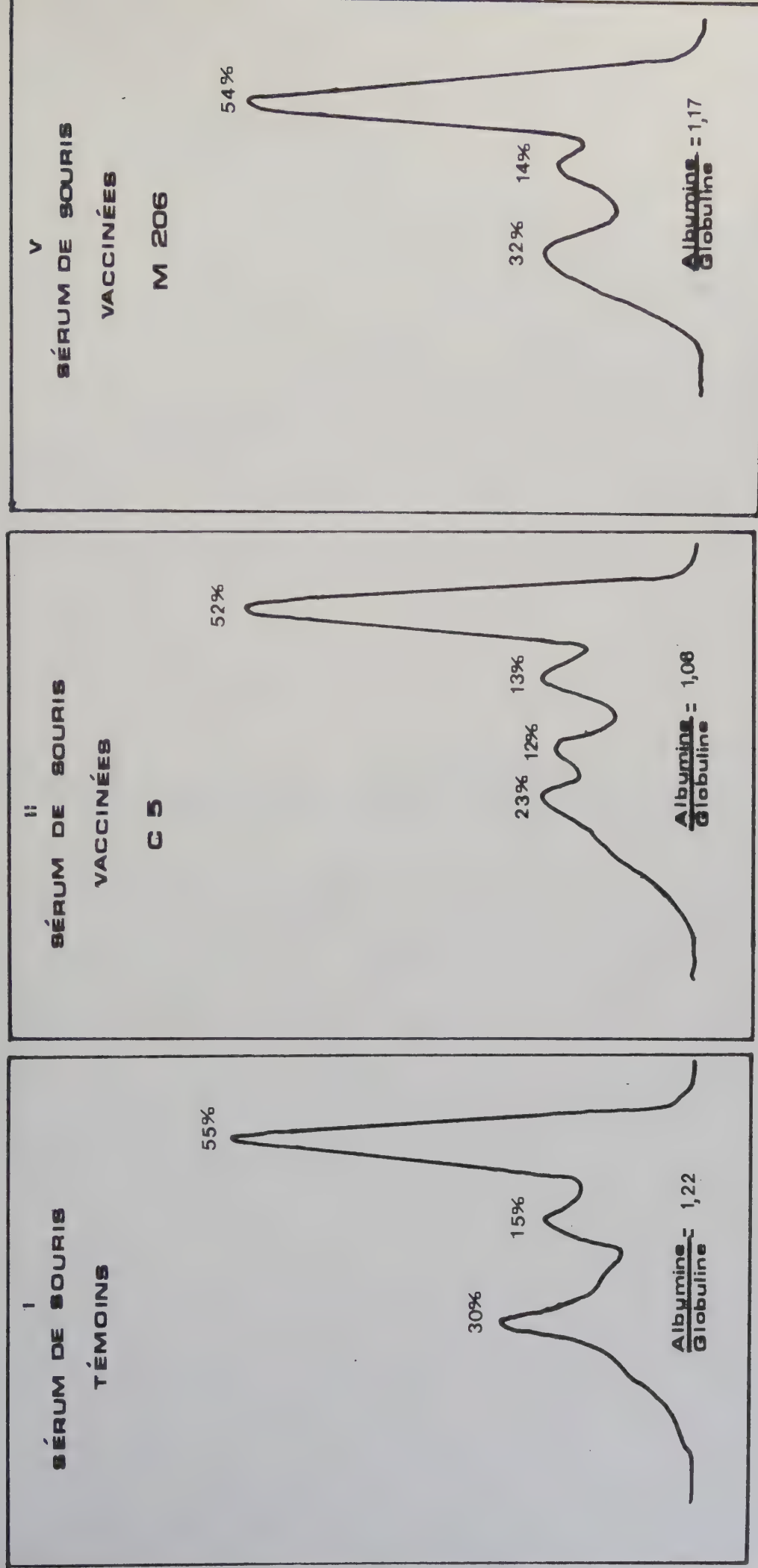


FIGURE 20 : PROFILS ÉLECTROPHORÉTIQUES DE SÉRUMS D'ANIMAUX VACCINÉS ET NON VACCINÉS

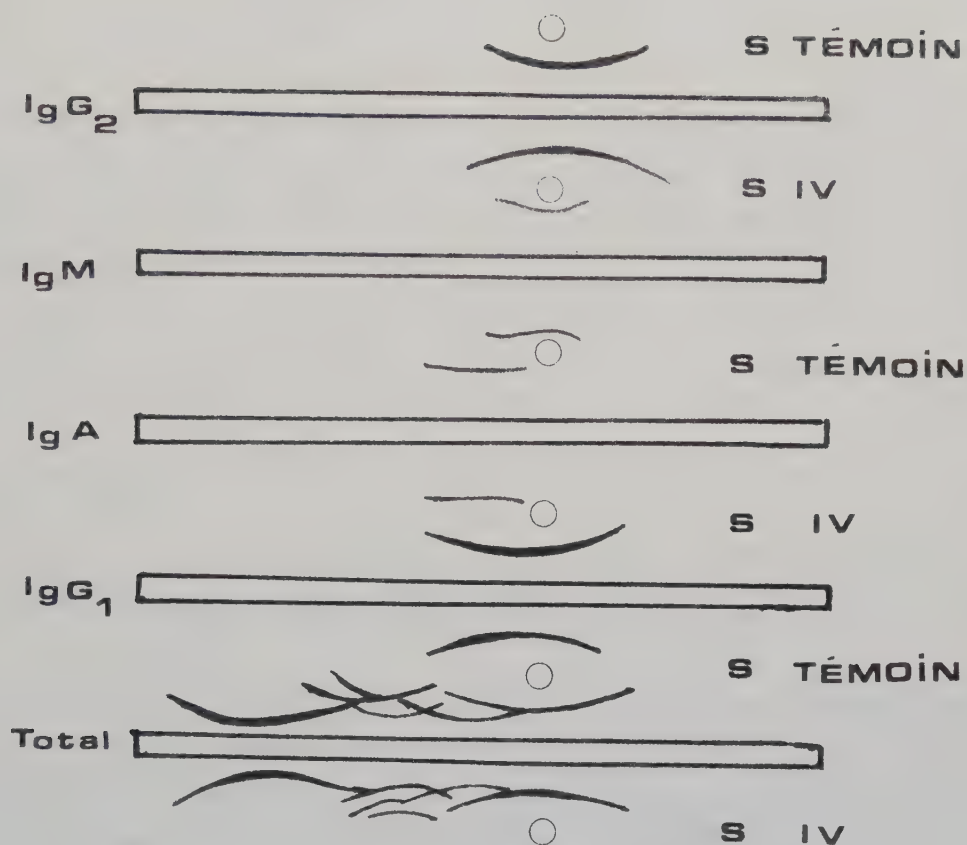


FIGURE : 21

IMMUNOELECTROPHORESE DE SÉRUMS ET DE LAVAGES
 INTESTINAUX D'ANIMAUX TÉMOINS ET D'ANIMAUX
 VACCINÉS .

4°) ISOELECTROFOCALISATION

Sachant que les pHi des immunoglobulines sont situés entre 6,5 et 8, nous avons appliqué la technique de séparation des protéines en fonction de leur pHi (isoélectrofocalisation) à un sérum d'animaux témoins, à un sérum d'animaux vaccinés et au liquide de lavage intestinal correspondant à ce dernier. Les profils de séparation obtenus sont donnés par la figure 22.

Nous avons pu mettre en évidence des IgG par immunodiffusion au niveau des fractions 20 à 35 du sérum témoin et du sérum d'animaux vaccinés. En revanche, nous n'avons pas pu caractériser d'IgM, d'IgA ou d'IgG dans les fractions séparées à partir des liquides de lavages intestinaux.

Il n'est donc pas possible de recourir à cette technique pour doser directement les différentes immunoglobulines.

5°) IMMUNODIFFUSION

a) Immunodiffusion double d'OUCHTERLONY :

En utilisant l'immunodiffusion double pour suivre la séparation chromatographique des différentes classes d'immunoglobulines (tableaux XXIII, XXIV), nous avons constaté que les échantillons non fractionnés donnaient des résultats plus nettement positifs que les éluats. Ceci nous a amenés à essayer d'adapter la méthode d'OUCHTERLONY au dosage spécifique des IgA et des IgG dans les sérums et les liquides de lavages intestinaux. Pour cela nous avons déposé dans le puits central la même quantité d'immunsérum spécifique et dans les puits périphériques des dilutions progressives, soit des sérums, soit des liquides de lavages intestinaux. L'intensité des arcs de précipitation a été appréciée de la manière suivante :

front de précipitation très net	:	+++
" " moyen	:	++
" " faible	:	+

Chaque + a été affecté d'un coefficient 4 et le chiffre ainsi obtenu a été multiplié par la dilution limite entraînant une réponse positive. Par exemple une réponse égale à ++ pour une dilution au 1/8 correspond à $2 \times 4 \times 8 = 64$, une réponse égale à +++

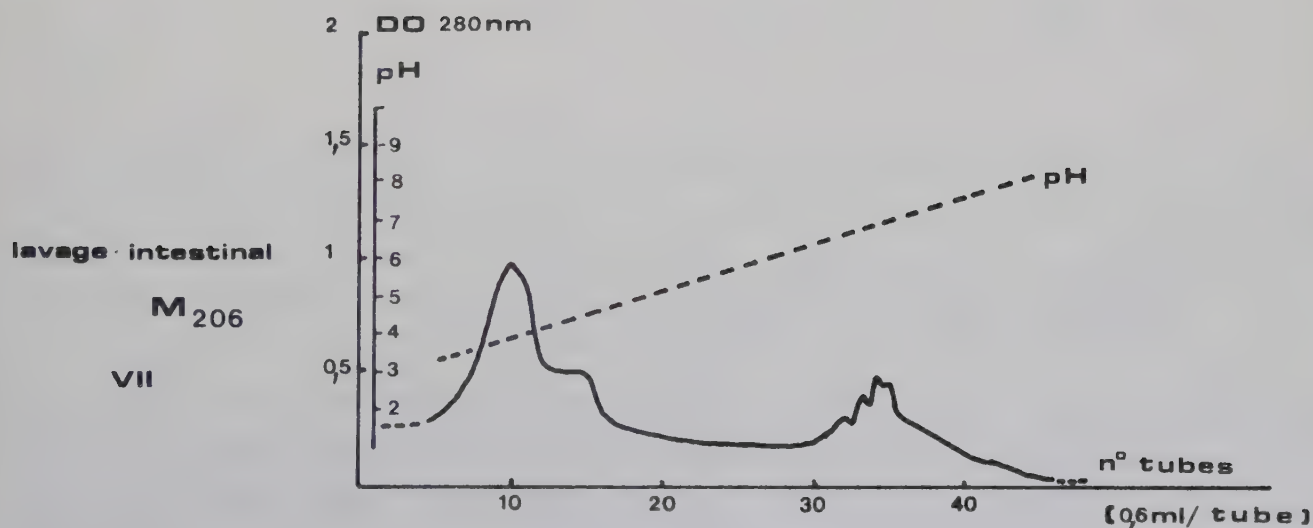
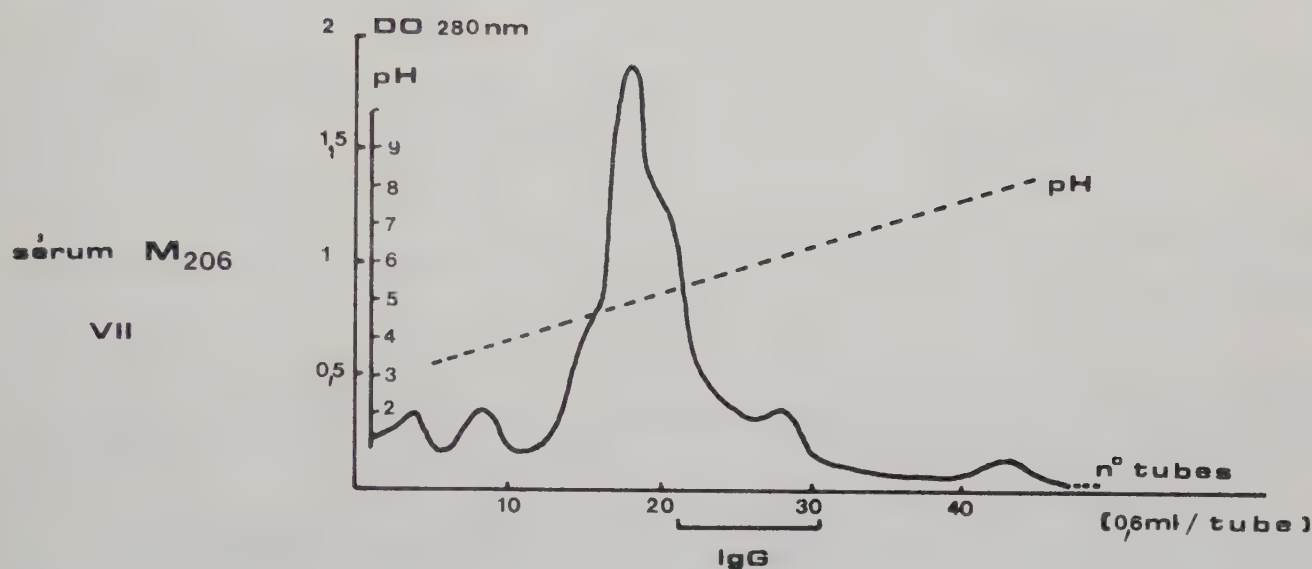
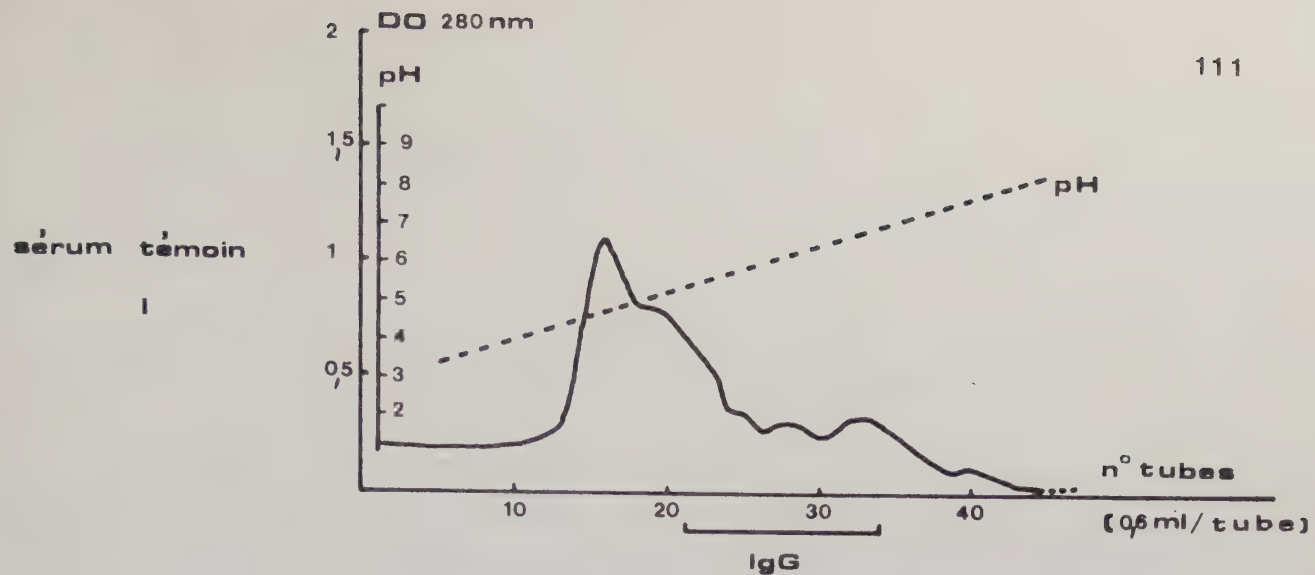


Figure 22 Profils d'élution après passage sur colonne d'isoélectro-focalisation de sérum et de lavage intestinal.

pour une dilution au 1/8 correspond à $3 \times 4 \times 8 = 96$ etc... Ces valeurs ont été finalement divisées par la concentration en protéines totales des échantillons analysés.

Les tableaux XXV et XXVI regroupent les résultats obtenus respectivement dans le cas des liquides de lavages intestinaux et des sérums.

Les taux d'IgA intestinales les plus élevés sont observés chez les lots III, VI et VII, c'est-à-dire chez les animaux vaccinés et éprouvés, ayant survécu à la dose d'épreuve de bactéries pathogènes, donc ayant subi une stimulation antigénique très forte. En ce qui concerne les animaux vaccinés mais non éprouvés il est intéressant de souligner que les taux d'IgA intestinales sont plus élevés au trentième jour qu'au dixième jour qui suit la vaccination. Les dosages d'IgG intestinales se sont révélés négatifs pour tous les lots sauf pour les lots VI et VII qui correspondent à des animaux ayant résisté à l'épreuve par les bactéries pathogènes.

On constate d'après le tableau XXVI que les taux d'IgA sériques sont faibles et ne subissent que de très légères variations quelle que soit la stimulation antigénique.

Les taux d'IgG sériques sont nettement supérieurs à ceux des IgA, ce qui a nécessité des dilutions très élevées.

b) Immunodiffusion radiale simple de MANCINI

L'utilisation de plaques d'immunodiffusion quantitative spécifiques des protéines de souris nous a permis de doser directement les IgA, les IgM, les IgG et les IgG₂.

Pour chacune de ces classes d'immunoglobulines, nous avons, dans un premier temps tracé une courbe d'étalonnage en mesurant les diamètres des anneaux de précipitation donnés par différentes dilutions d'un sérum étalon de concentration connue. La figure 23 montre le profil des courbes obtenues dans chacun des cas.

Ces courbes d'étalonnage nous ont ensuite servi à doser les immunoglobulines dans les divers échantillons. Les résultats concernant les IgA, les IgG₁ et les IgG₂ des liquides de lavages intestinaux figurent dans le tableau XXVII. Nous n'avons pas dosé les IgM intestinales, la recherche préalable de ces immunoglobulines s'étant révélée négative (tableau XXVIII).

	TÉMOIN I	VACCIN C 5		VACCIN M 206			
		II Vaccinés t 35	III Vaccinés éprouvés t 60	IV Vaccinés t 15	V Vaccinés t 35	VI Vaccinés et éprouvés t 40	VII t 60
protéines totales en µg/ µl	2,24	5,36	3,76	5,12	5,48	8	6,49
réponses en IgA	+	+	+	+	+	+	+
		+	+		+	+	+
					+	+	+
						+	+
en IgG						+	+
dil. limite x coef. prot. totales	1,8	11,9	17,1	6,2	11,6	16	19,7
	0	0	0	0	0	2	2,15

TABEAU XXV

DETERMINATION SEMI-QUANTITATIVE DES VARIATIONS DES
IgA ET IgG INTESTINALES PAR IMMUNODIFFUSION DOUBLE.

TÉMOINS		VACCIN C 5		VACCIN M 206				
		I	II vaccinés t 35	III vaccinés et éprouvés t 60	IV vaccinés t 15	V vaccinés t 35	VI vaccinés et éprouvés t 40	VII t 60
Protéines totales (µg / ml)		44,4	40	53,6	72	44,4	55,2	45,4
Réponse en Ig A	1/4	+	+	+		+	+	+
	1/8	+	+	+		+	+	+
	1/16					+	+	+
Réponse en Ig G	1/256	+	+	+	+	+	+	+
	1/512	+	+	+	+	+	+	+
	1/1024				+	+		+
	1/2048					+		+
Ig A		0,72	0,8	0,8	0	1,44	1,16	1,4
Ig G		46,2	51,2	38,2	28,4	92,25	37,1	180

TABLEAU XXVI DÉTERMINATION SEMI-QUANTITATIVE DES VARIATIONS DES
Ig A ET DES Ig G SÉRIQUES PAR IMMUNODIFFUSION DOUBLE

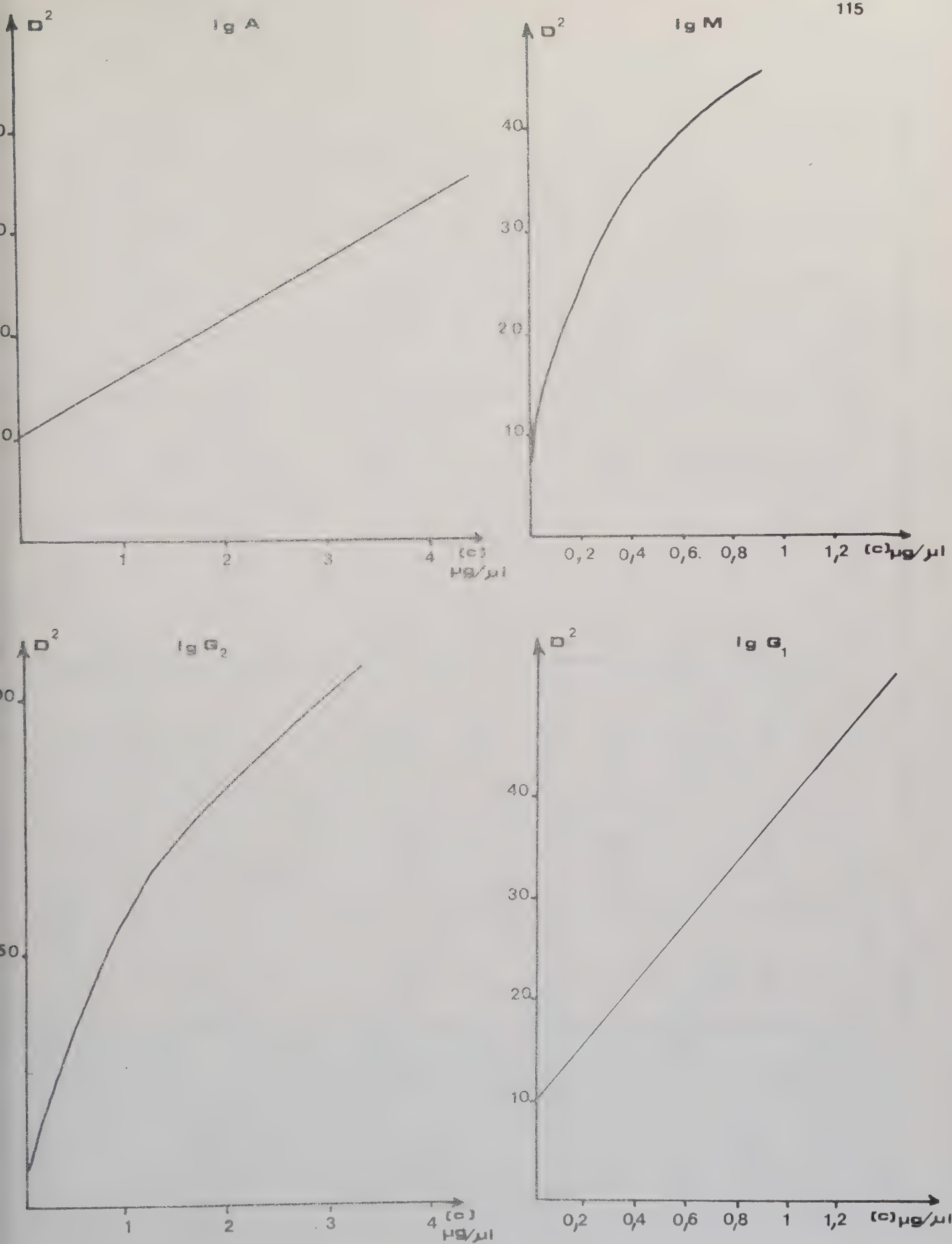


Figure 23

COURBES ETALONS UTILISEES POUR LA DETERMINATION
QUANTITATIVE DES IMMUNOGLOBULINES PAR LA
METHODE DE MANCINI.

	classees immunoglobulines	TEMOINS I	VACCIN C 5		VACCIN M 206			
			II vaccinés t ₃₅	III vaccinés et épreuves t ₆₀	IV vaccinés t ₁₅	V vaccinés t ₃₅	VI vaccinés et épreuves t ₄₀	VII vaccinés et épreuves t ₆₀
protéines totales µg/µl		2,24	5,36	376	5,12	5,48	8	6,49
D	IgA	3,7	5,4	5	4,4	5,35	6,3	5,9
diamètre de l'anneau de précipitation	IgG ₁	4	5,2	5,6	3,5	5,7	6,7	7,1
en mm	IgG ₂	tr	tr	0	3,5	1,75	3,6	1,8
D ²	IgA	13,68	29,16	25	19,36	28,64	39,69	34,97
	IgG ₁	16	27,04	30,2	12,25	33,9	44,9	50,4
	IgG ₂	tr	0	0	11,25	6,12	12,96	6,48
concentration en immunoglobul. µg/µl	IgA	0,58	3,24	2,54	1,54	3,18	4,9	4,18
	IgG ₁	0,2	0,56	0,66	0,08	0,78	1,18	1,31
	IgG ₂	tr	tr	0	0,07	0,04	0,05	0,02
pourcentage en immunoglobul. ★	IgA	25,8	60,4	67,5	30	58	61	64,45
	IgG ₁	8,92	10,4	17,6	1,56	14,2	14,7	20,1
	IgG ₂	tr	tr	0	1,36	0,7	0,6	0,3

★ pourcentage en immunoglobulines par rapport aux protéines de PM > 50.000

tr: traces

TABLEAU XXVII VALEURS DES IMMUNOGLOBULINES INTESTINALES APRÈS

VACCINATION PAR VOIE ORALE

		TÉMOINS	VACCIN C 5		VACCIN M 206				
			I	II vaccinés t 36	III vaccinés et éprouvés t 60	IV vaccinés t 15	V vaccinés t 35	VI vaccinés et éprouvés t 40	VII t 60
Protéines totales(µg µl)			44,4	40	53,6	72	44,4	55,2	45,4
D	diamètre de	Ig A	4,3	4,3	4,3	3,9	4,7	5	5,1
	l'anneau de	Ig G ₁	4,8	5,2	5	5,5	5,2	5,2	5,35
	précipitation	Ig G ₂	5,9	5,8	5,5	6,5	6,5	6,3	6,65
	en nm	Ig M	4,8	4,9	4,9	5,5	5	4,8	5
D 2		Ig A	18,49	18,49	18,49	15,21	22,18	25	26,17
		Ig G ₁	23	27	25	30,25	26,5	27	28,5
		Ig G ₂	35	33,5	30,25	42,25	42,25	39,5	44,25
		Ig M	23	24	24	30,25	25	23	25
concentration en immuno- globulines en µg/µl		Ig A	1,4	1,4	1,4	0,81	2,06	2,56	2,72
		Ig G ₁	2,3	2,8	2,5	3,3	2,75	2,85	3,1
		Ig G ₂	2,15	2,1	1,85	3,3	2,9	2,7	3,25
		Ig M	0,18	0,2	0,2	0,31	0,22	0,18	0,22
Pourcentage en immunoglo- bulines		Ig A	3,15	3,5	2,61	1,12	4,6	4,6	6
		Ig G ₁	5,18	7	4,65	4,6	6,2	5,1	6,8
		Ig G ₂	4,84	5,25	3,45	4,6	6,5	4,9	7,15
		Ig M	0,4	0,5	0,37	0,43	0,5	0,32	0,48

TABLEAU XXVIII

MESURE DU TAUX D'IMMUNOGLOBULINES SÉRIQUES APRÈS
VACCINATION PAR VOIE ORALE.

Les résultats des dosages des IgA, IgG₁, IgG₂ et IgM sériques sont donnés par le tableau XXVIII.

Ces résultats ont été repris sous une autre forme dans le tableau XXIX. Celui-ci fait mieux ressortir les variations des immunoglobulines chez les animaux vaccinés d'une part, chez les animaux vaccinés et éprouvés d'autre part.

On peut constater que les IgA prédominent nettement au niveau intestinal. Leur taux augmente de manière significative après la vaccination par voie buccale quel que soit le vaccin utilisé. Cette augmentation est encore plus marquée chez les animaux qui ont reçu une dose d'épreuve de bactéries pathogènes et qui ont de ce fait, été soumis à une très forte stimulation antigénique.

Au niveau sérique le taux des IgA est faible et subit peu de modification aussi bien après la vaccination qu'après l'ingestion de bactéries pathogènes.

Si l'on considère le rapport $\frac{\text{IgA intestinale}}{\text{IgA sérique}}$ on constate que celui-ci diminue lorsqu'on passe de t 15 à t 35.

Chez les animaux vaccinés le taux des IgG intestinales est faible par rapport à celui des IgA. Toutefois, il augmente légèrement lorsqu'on passe de t 15 à t 35. Cette augmentation est encore plus nette chez les animaux éprouvés.

Dans tous les cas, la montée des IgG résulte d'une élévation du taux des IgG₁, celui des IgG₂ ayant, au contraire, tendance à diminuer.

Dans les sérums le taux des IgG est supérieur à celui des IgA. Il ne subit qu'une légère augmentation au cours de la vaccination et, contrairement à ce que l'on observe au niveau intestinal, les IgG₁ et les IgG₂ évoluent d'une manière parallèle.

Le rapport $\frac{\text{IgG intestinales}}{\text{IgG sériques}}$ augmente lorsqu'on passe de t 15 à t 35, il s'élève également chez les animaux éprouvés par la bactérie pathogène.

D'autre part, les résultats obtenus montrent que la vaccination par voie buccale entraîne une augmentation du taux des immunoglobulines totales, tant au niveau intestinal qu'au niveau sérique.

Nature des immunoglobul.	TEMOIN	VACCIN C 5		VACCIN M 206			
	I	II	III	IV	V	VI	VII
		vaccines t 35	vaccines et eprouves t 60	vaccines t 15	vaccines t 35	vaccines t 40	et eprouves t 60
Ig A LI	25,8	61	67,5	30	58	61	64,4
Ig G LI	8,92	10,4	17,6	2,92	14,9	15,3	20,4
Ig G ₁ LI	8,92	10,4	17,6	1,56	14,2	14,7	20,1
Ig G ₂ LI	tr	tr	0	1,36	0,7	0,6	0,3
Ig A Se	3,15	3,5	2,6	1,12	4,6	4,9	6
Ig G Se	10,03	12,25	8,6	9,2	12,7	9,9	13,9
Ig G ₁ Se	5,18	7	4,65	4,6	6,2	5	6,8
Ig G ₂ Se	4,85	5,2	3,45	4,6	6,5	4,9	7,15
γ Globulines totales Se	13,18	15,75	11,2	10,3	17,3	15	20
γ Globulines totales LI	34,72	71,4	85	32,9	72,9	76,3	84,8
$\frac{\text{Ig A LI}}{\text{Ig A Se}}$	8,19	17,4	25,8	26,8	12,6	12,4	10,7
$\frac{\text{Ig G LI}}{\text{Ig G Se}}$	0,9	0,85	2,05	0,32	1,17	1,5	1,46

tr: traces

TABLEAU XXIX: Modification des taux d'immunoglobulines induites
par les deux types de vaccin.



FIGURE 24

COUPE HISTOLOGIQUE D'INTESTIN GRÈLE DE SOURIS
APRÈS VACCINATION PAR VOIE ORALE .

6°) CONTROLE HISTOLOGIQUE

Le contrôle histologique des coupes d'intestin par immunofluorescence (fig. 24) nous a permis de mettre en évidence des quantités importantes d'IgA au niveau du cytoplasme des cellules lymphoïdes du chorion de la muqueuse. Cependant, nous n'avons jamais observé de différence significative entre les lots témoins et les lots d'animaux vaccinés, que ces derniers fussent sacrifiés dix jours ou trente jours après la vaccination.

DISCUSSION

Après avoir déterminé les conditions qui permettent de vacciner efficacement la souris par voie orale contre Salmonella typhimurium, nous avons cherché à mesurer les variations des différentes classes d'immunoglobulines consécutives à cette vaccination, à la fois dans les sécrétions intestinales et dans les sérums.

L'étude de l'évolution des immunoglobulines sécrétoires s'imposait dans la mesure où la synthèse de ces protéines constitue la réponse de toute muqueuse à l'arrivée d'un antigène. Ceci a été démontré en particulier sur l'anse intestinale isolée du lapin qui, mise en contact avec des salmonelles vivantes, fabrique des IgG et des IgA (134). Mais dans la classe des IgA il était également intéressant de pouvoir distinguer les IgAS puisque celles-ci sont considérées comme étant les anticorps prédominants des sécrétions externes.

Lorsque nous avons abordé ce travail, il n'existait pas dans le commerce, de plaques d'immunodiffusion radiale pour le dosage spécifique des IgM, des IgA et des IgG de souris. Nous avons donc essayé de résoudre ce problème en faisant appel à des méthodes de séparation des protéines.

La première technique que nous avons utilisée est la chromatographie d'exclusion sur colonne, qui permet un fractionnement des protéines en fonction de leur poids moléculaires. Jusqu'à présent c'est le sel de Séphadex G-200 qui a été le plus souvent employé dans les essais de séparation des immunoglobulines (48,318,320,420). Si le pouvoir de résolution de ce gel est correct pour les IgM, en revanche il ne

permet pas de dissocier le couple IgG-IgA, à moins de répéter plusieurs fois l'opération, comme l'a fait VAERMAN (420). Une telle technique n'est envisageable que si l'on dispose d'une quantité importante de sérum. Après une étude comparative, nous avons retenu pour nos essais l'Indubiose AcA 2-2, dont l'efficacité s'est révélée supérieure à celle du Séphadex G-200. On pouvait difficilement espérer obtenir un dosage direct des immunoglobulines par simple planimétrie des pics séparés après chromatographie d'exclusion, dans la mesure où ces molécules peuvent se présenter sous des formes plus ou moins polymérisées. Nous avons donc essayé d'identifier les constituants de chaque pic par des réactions sérologiques spécifiques soit des anticorps anti-O, soit des IgM, des IgA, des IgG₁ et des IgG₂.

En fait, le titrage des anticorps anti-O n'a donné des résultats nettement positifs qu'avec les totums, les éluats de chromatographie étant probablement trop dilués pour se prêter à un tel dosage.

Cette méthode a cependant permis de constater que le taux de ces anticorps demeurait très faible dans les liquides de lavages intestinaux, mais qu'il augmentait en revanche dans les sérums après vaccination, les valeurs les plus élevées étant obtenues après utilisation du vaccin vivant.

L'immunodiffusion double s'est révélée plus efficace pour l'identification des éluats. Elle montre que les IgA prédominent très nettement au niveau intestinal tandis que dans les sérums on trouve essentiellement des IgG avec une majorité d'IgG₁, que les pics des immunoglobulines identifiées sont contaminés par d'autres protéines et que certaines de ces immunoglobulines sont polydispersées puisqu'on les retrouve dans des pics différents. Ceci est le cas en particulier pour les IgA intestinales.

Nous n'avons pas essayé la chromatographie par échange d'ions comme technique de dosage des immunoglobulines. Si cette méthode a permis à plusieurs auteurs d'isoler la pièce sécrétoire (85,253,320), son utilisation par ZSCHOKE (462) pour la purification de l'IgA humaine a nécessité de multiples étapes et des quantités importantes de matériel de départ.

L'électrophorèse de zone ne nous a permis de mettre en évidence qu'une légère augmentation des globulines dans les sérums d'animaux vaccinés. Quant à l'immunoélectrophorèse elle montre la présence d'IgA, d'IgM, d'IgG₁ et d'IgG₂ dans tous les lots de sérum sans que l'on puisse constater de différences entre les sérums des animaux vaccinés et ceux des animaux témoins. Il est d'ailleurs bien connu qu'il s'agit d'une méthode purement qualitative et que sa sensibilité est inférieure à celle de l'immuno-diffusion radiale.

La technique d'isoélectrofocalisation dans la zone de pH comprise entre 3 et 10 s'est révélée insuffisante pour le dosage direct des différentes classes d'immunoglobulines. Nous n'avons en effet pu mettre en évidence dans les sérums que des IgG incomplètement séparées des autres protéines. Aucun des pics obtenus dans le cas des lavages intestinaux n'a donné, en immunodiffusion, les arcs de précipitation caractéristique des immunoglobulines, probablement à cause de la concentration trop faible en protéines des fractions recueillies.

Ce sont finalement les techniques d'immunodiffusion qui nous ont donné les meilleurs résultats à la fois sur le plan qualitatif et sur le plan quantitatif. Disposant d'antisérums spécifiques des IgM, IgA et IgG de souris, nous avons cherché à adapter la méthode d'immunodiffusion double d'OUCHTERLONY à une détermination semi-quantitative de ces immunoglobulines. En utilisant des dilutions progressives d'antisérums, nous avons constaté une nette augmentation des IgA intestinales chez les animaux vaccinés, sans qu'il soit possible de relever une différence significative entre les souris ayant reçu le vaccin vivant et celles auxquelles on avait administré le vaccin tué. La même technique appliquée aux sérums a mis en évidence une nette prédominance des IgG à ce niveau. Celles-ci ont peu varié après la vaccination, seuls les animaux vaccinés à l'aide du vaccin vivant ont présenté une légère augmentation de leurs IgG sériques.

Dès que nous avons pu trouver dans le commerce des plaques d'immunodiffusion quantitative spécifiques des protéines de souris, nous avons repris l'ensemble des dosages des immunoglobulines en faisant appel à la technique d'immunodiffusion radiale de MANCINI. Pratiquée avec soins celle-ci peut en effet donner une précision de l'ordre de 5 p.100. Ceci nous a permis d'établir avec une exactitude suffisante les rapports $\frac{\text{immunoglobulines intestinales}}{\text{immunoglobulines sériques}}$.

Les résultats obtenus grâce à cette méthode confirment la prédominance des IgA au niveau intestinal et l'augmentation de ces immunoglobulines après vaccination. Cette augmentation est légèrement plus élevée chez les animaux vaccinés à l'aide de la bactérie pathogène tuée, elle est encore plus nette chez ceux qui ont survécu à une dose d'épreuve de bactéries pathogènes.

Au niveau sérique, l'immunodiffusion radiale met en évidence une légère augmentation des IgG chez tous les animaux vaccinés, celle-ci étant cependant plus grande dans le cas d'utilisation du vaccin vivant. Il est intéressant de souligner que les IgM ne subissent aucune variation sensible après la vaccination.

Pour mieux saisir une relation éventuelle entre le degré de protection et le profil des immunoglobulines, nous avons mis en parallèle dans le tableau XXX les résultats du dosage de ces protéines et les index d'efficacité observés après vaccination. Bien qu'on observe une augmentation importante et précoce des IgA intestinales, ainsi que des IgG₁ et une élévation plus légère et plus tardive des IgG₂ sériques, il n'apparaît aucun lien entre le taux des différentes immunoglobulines et l'efficacité de la vaccination.

On peut donc penser que les taux d'IgA, d'IgM ou d'IgG ne reflètent pas directement le degré d'immunité. Cette constatation rejoint une idée de plus en plus admise aujourd'hui, à savoir que le titrage des anticorps n'apporte pas de renseignements sur la capacité d'un organisme à s'opposer à la prolifération d'une bactérie virulente (296).

Il est peu probable que le dosage spécifique des IgA sécrétoires (IgAs) aurait modifié cette conclusion. En fait nous n'avons pas pu déterminer le taux de ces immunoglobulines puisque les différentes techniques de fonctionnement des protéines que nous avons utilisées n'ont pas permis de les séparer. Il n'est pas certain que les résultats eussent été meilleurs si nous avions pu disposer d'un sérum anti IgAs de souris. La spécificité antigénique propre de l'IgAs est en effet très faible, les principaux déterminants antigéniques de cette molécule étant communs, soit à la pièce sécrétoire (SP) sous forme monomérique (428), soit à l'IgA (403). Or il est bien connu que les sécrétions et en particulier les sécrétions intestinales peuvent contenir SP sous forme libre (429) et des IgA sous des formes plus ou moins polymérisées (177,178). On peut souligner également que les travaux consacrés jusqu'à présent aux IgAs de souris ont été effectués pour la plupart sur des protéines d'origine myélomateuse, plus faciles à obtenir en quantités relativement importantes.

	INDEX D' EFFICACITE*	LAVAGES INTESTINAUX(LI)			SERUMS (SE)				$\frac{\text{Ig A LI}}{\text{Ig A SE}}$ $\frac{\text{Ig G L}}{\text{Ig G SE}}$	
		Ig A	Ig G ₁	Ig G ₂	Ig A	Ig G ₁	Ig G ₂	Ig M		
TÉMOINS	—	25,8	8,9	tr	3,15	5,18	4,84	0,4	8,19	0,9
II VACCIN C ₅ t ₃₅	36	60,4	10,4	tr	3,5	7	5,25	0,5	17,4	0,85
IV VACCIN M206 t ₁₅	62	30	1,56	1,36	1,12	4,6	4,6	0,43	26,8	0,32
V VACCIN M206 t ₃₅	69,6	58	14,2	0,7	4,6	6,2	6,5	0,5	12,6	1,17

TABEAU XXX

COMPARAISON DES INDEX D'EFFICACITÉ ET DES TAUX D'IMMUNOGLOBULINES
EN FONCTION DE LA NATURE DES VACCINS ET DES DÉLAIS D'ADMINISTRATION DE L'ÉPREUVE .

tr = traces

* index d'efficacité: $\frac{\% \text{ mortalité des témoins} - \% \text{ mortalité des vaccinés}}{\% \text{ mortalité des témoins}}$

CONCLUSION

L'étude des variations du taux des immunoglobulines chez la souris vaccinée par voie orale à l'aide d'une souche pathogène inactivée et d'une souche avirulente vivante de Salmonella typhimurium fait apparaître une nette augmentation des IgA et des IgG₁ intestinales, et un léger accroissement des taux des IgG₂ sériques entre le dixième et le trentième jour qui suivent la vaccination.

Bien qu'il y ait des différences d'efficacité considérables entre les deux vaccins, on n'observe aucune corrélation entre les taux d'IgM, d'IgA, d'IgG₁ ou d'IgG₂ et le degré de protection des animaux vis-à-vis d'une dose d'épreuve de la bactérie pathogène.

TROISIEME PARTIE

DISCUSSION GENERALE ET CONCLUSIONS

DISCUSSION GENERALE

Les progrès de l'hygiène, l'efficacité des antibiotiques actuellement disponibles, la répugnance des sujets à recevoir des injections sont autant de facteurs qui ont contribué à la mise en doute de l'utilité de la vaccination contre les salmonelloses. Pourtant l'immunisation conserve un grand intérêt dans la mesure où elle demeure le seul moyen préventif à long terme utilisable sur une grande échelle. Elle constitue aussi la meilleure parade à l'apparition éventuelle de mutants résistant aux antibiotiques. On peut penser enfin que les travaux qui s'y rapportent devraient déboucher sur une connaissance plus approfondie des mécanismes de défense de l'organisme contre les infections bactériennes.

Pour des raisons psychologiques, c'est la voie buccale qu'on devrait utiliser de plus en plus dans la vaccination. Encore faut-il démontrer que la protection ainsi obtenue est pour le moins aussi efficace que celle qui résulte d'une immunisation par voie parentérale. Parmi les différents types de vaccins utilisables que représentent les bactéries pathogènes inactivées, les bactéries avirulentes vivantes ou les fractions antigéniques extraites soit de ces microorganismes, soit de leurs surnageants de culture, il importe également de connaître celui qui protège le mieux les sujets contre la souche virulente. Le rythme de vaccination constitue un autre paramètre dont il est nécessaire de vérifier l'influence sur l'immunité. Il convient enfin de déterminer l'importance relative des phénomènes immunitaires locaux résultant de l'administration d'un vaccin par la voie digestive. C'est à l'ensemble de ces questions que nous avons cherché à répondre, au moins partiellement, par cette étude

Afin de pouvoir multiplier les expériences et opérer sur un nombre suffisamment important d'animaux, nous avons choisi de travailler sur des souris. Pour des raisons de commodité, nous avons utilisé des Balb/c bien que AUZINS et ROWLEY (19) aient montré que cette souche immunisée par voie parentérale répond moins bien à certains antigènes des Salmonelles, en particulier à l'antigène 5, que d'autres souches telles que la S.W. (Swiss White). Il est en effet démontré qu'il s'agit d'un simple problème de quantité d'antigène que, pour notre part, nous avons résolu en recherchant la dose optimale de vaccin capable de protéger efficacement l'animal contre la bactérie d'épreuve.

Cherchant à étudier les variations de l'immunité intestinale, il nous fallait une bactérie dont le mode normal de pénétration fut la voie digestive. Habituellement, lorsqu'on veut provoquer une Salmonellose expérimentale chez les rongeurs, on fait appel, soit à Salmonella enteritidis, soit à Salmonella typhimurium. C'est la seconde espèce que nous avons retenue parce que nous disposions à la fois d'une souche hautement virulente pour la souris, la souche C₅S et d'un mutant dépourvu de pouvoir pathogène, la souche M 206.

Le principal intérêt de dosage des différentes classes d'immunoglobulines étant de permettre la mise en évidence éventuelle d'une relation entre le taux de ces protéines et le degré d'immunité des animaux, nous avons d'abord défini les meilleures conditions de vaccination des souris Balb/c. Ceci impliquant la recherche préalable de la quantité de bactéries pathogènes capable de tuer un pourcentage élevé d'animaux en un temps suffisamment court. Sachant que les différentes espèces de souris ne réagissent pas de la même manière vis-à-vis d'un même antigène (19), il fallait également déterminer la dose de vaccin nécessaire pour obtenir une protection efficace contre une dose létale de bactéries virulentes. Mais d'autres paramètres importants ont dû être précisés. C'est ainsi que la plupart des auteurs (278,333,336,387,466), choisissent d'administrer la dose d'épreuve de bactéries pathogènes par voie intrapéritonéale. Cette façon d'opérer permet de connaître avec précision la quantité de germes injectés. Elle présente en outre l'avantage d'être rapidement suivie d'effet (entre deux et six jours) et donc de raccourcir considérablement la durée de l'expérience.

Nous avons préféré utiliser la voie buccale et donc nous rapprocher des conditions normales de l'infection, le nombre de bactéries avalées par l'animal étant connu d'une manière assez précise, grâce à l'utilisation de canules adaptées à des seringes à insuline.

Il est certain qu'avec ce mode opératoire l'effet létal se trouve retardé et que l'on peut alors se poser le problème de savoir quand arrêter le comptage des animaux morts. Nous avons remarqué qu'il n'y avait pratiquement plus de décès après le dix septième jour suivant l'épreuve. Cependant nous avons prolongé l'observation pendant une semaine supplémentaire.

Parmi les facteurs susceptibles de modifier les résultats, il fallait envisager également l'intervalle de temps séparant la vaccination du contrôle d'efficacité. RAETTIG (338), ANDRE (10) et DENCHEV (122) considèrent que la réponse immunitaire

locale est maximale entre le septième et le quatorzième jour, et estiment que cette période est la plus significative pour l'administration de la dose d'épreuve. STERN et TRIM (387) ont cependant montré qu'il fallait opérer après le quatorzième jour si l'on voulait éviter l'interférence des facteurs d'immunité non spécifiques. GERMANIER (466) souligne que l'activité de ces dernières est considérablement prolongée chez les souris vaccinées à l'aide de vaccins vivants par rapport à celles qui ont reçu un vaccin inactivé.

Nous avons choisi d'éprouver au trentième jour après avoir vérifié que les résultats ainsi obtenus étaient aussi favorables que ceux observés en effectuant l'épreuve au dixième jour. On peut noter d'ailleurs que GERMANIER (466) a adopté le même délai chez la souris et que MYNARD (278) travaillant sur des rats a montré que la protection était maximale vers le trentième jour qui suit la vaccination.

En ce qui concerne le test d'efficacité, nous avons opté pour la détermination du taux de survie des animaux, ce critère étant considéré comme indiscutable par la plupart des auteurs.

Ces conditions opératoires nous ont permis de démontrer que le meilleur rythme de vaccination correspond à l'administration quotidienne de l'antigène pendant cinq jours consécutifs. L'examen des résultats obtenus jusqu'à présent avec les vaccins buccaux montre d'ailleurs que les vaccinations répétées à intervalles rapprochés confèrent une meilleure protection que les vaccinations uniques ou suivies d'un simple rappel (333).

Les essais comparatifs que nous avons effectués avec la souche pathogène tuée et le mutant avirulent mettent en évidence la nette supériorité du vaccin vivant sur le vaccin inactivé. GERMANIER (465) aboutit à des conclusions identiques au terme d'une étude où il a vacciné en parallèle des souris Balb/c, à l'aide de Salmonella typhimurium C5S inactivé par la chaleur et d'un mutant vivant de la même espèce bactérienne ne possédant pas UDP-galactose 4 épimérase.

Bien que l'efficacité des vaccins vivants soit aujourd'hui démontrée (296) l'utilisation de bactéries vivantes chez l'homme en particulier, pose de nombreux problèmes, que nous avons évoqués dans l'introduction (cf. page 11). Il convient d'ajouter que toutes les Salmonelles non pathogènes ne présentent pas le même pouvoir protecteur. D'après GERMANIER (465) seuls sont aptes à vacciner efficacement les souches sauvages atténuées et les mutants R capables de subir une reversion phéno-

typique in vivo. Ces dernières ne possèdent plus l'équipement enzymatique nécessaire à la synthèse de certains glucides constitutifs de l'antigène O. Ils peuvent néanmoins fabriquer un polyside spécifique complet à partir des glucides présents dans l'organisme hôte. Il apparaît donc que l'antigène O joue un rôle important dans l'immunité contre les salmonelles, bien que le lipopolysaccharide purifié soit incapable à lui seul de conférer une protection. Le mutant M 206 que nous avons utilisé dans cette étude possède effectivement cet antigène, mais à un taux beaucoup plus faible que la souche sauvage correspondante (13). D'autre part, les essais de protection effectués à l'aide de lipopolysaccharides ou de bactéries pathogènes inactivées, associées à des souches vivantes dépourvues elles mêmes de pouvoir immunogène, ne donnent pas de résultats positifs (465). Ceci montre que l'antigène O doit être directement lié à des microorganismes vivants. GERMANIER (465) pense que la protection de la souris contre les Salmonelles, serait essentiellement le fait d'une immunité cellulaire. Celle-ci résulterait d'une stimulation de l'activité phagocytaire des macrophages qui ne peut être induite que par des bactéries vivantes possédant un lipopolysaccharide complet. Cet auteur n'exclut cependant pas d'autres explications, c'est ainsi que la supériorité du vaccin vivant pourrait résulter selon lui, d'une stimulation antigénique à la fois plus importante et plus prolongée. Il souligne à ce propos que lorsqu'on immunise les souris à l'aide d'un mutant avirulent vivant de Salmonella typhimurium on peut encore déceler la présence de ce dernier dans la rate des animaux, quinze jours après la vaccination.

Cette persistance des bactéries vivantes dans l'organisme constitue précisément un argument décisif pour ceux qui manifestent une hostilité de principe à l'égard des vaccins vivants (215). Théoriquement les mutants R des Salmonelles utilisables comme vaccins subissent une lyse rapide in vivo (464). D'autre part, les nombreux essais de vaccination pratiqués avec des mutants avirulents de Shigelles n'ont jamais permis de mettre en évidence des phénomènes de reversion in vivo alors que celle-ci demeure possible in vitro (296).

L'utilisation de fractions antigéniques provenant des bactéries ne rencontre pas les mêmes réticences. C'est pourquoi les résultats favorables que nous avons obtenus avec l'antigène, extrait du surnageant de culture de la souche M 206, présente un grand intérêt, d'autant plus qu'il s'agit d'un constituant qui protège plus efficacement la souris par voie buccale que par voie intrapéritonéale. Cette constatation confirme la supériorité de la voie orale sur la voie parentérale pour la protection contre les Salmonelles. Sans entrer ici dans le détail de la composition chimique de cet antigène, nous pouvons noter que sa composition en glucides est différente de

celle de l'antigène O. On peut en déduire que le lipopolysaccharide n'intervient dans la vaccination que d'une manière indirecte. Il est bien connu que l'endotoxine complète protège les *Salmonelles* contre la lyse par l'association anticorps-complément (467). Sa présence dans les vaccins vivants prolonge donc l'effet antigénique des fractions véritablement douées d'un pouvoir protecteur.

Ayant précisé les conditions optimales d'immunisation de la souris par voie orale contre *Salmonella typhimurium*, nous avons étudié les variations des taux d'immunoglobulines intestinales et sériques consécutives à cette vaccination.

Les résultats obtenus montrent que le taux d'anticorps spécifiques de l'antigène O augmente dans le sérum des souris immunisées, particulièrement lorsqu'on utilise le vaccin vivant. En revanche, on n'observe pas de variations significatives de ces anticorps au niveau intestinal. Cette constatation est à rapprocher de celle de DUSHKIN (463). En effet, ce dernier n'a pas pu déceler d'agglutinines spécifiques dans les lavages intestinaux de souris vaccinées par voie orale à l'aide d'une souche avirulente vivante d'*Escherichia coli*. Si l'on admet aujourd'hui l'absence de parallélisme entre le taux des anticorps sériques spécifiques et le degré d'immunité vis-à-vis des entérobactéries pathogènes (296) on peut adopter les mêmes conclusions en ce qui concerne les anticorps des sécrétions intestinales.

Les dosages d'IgA, d'IgM et d'IgG que nous avons pratiqués à la fois sur les sérums et les liquides de lavages intestinaux montrent que les IgA sont les immunoglobulines prédominantes des sécrétions intestinales de la souris, ce qui confirme les observations de BENVENISTE (41) et DUSHKIN (463) concernant cet animal. Bien que ces dosages mettent en évidence une augmentation des IgA et des IgG₁ intestinales, ainsi qu'une élévation des IgG₂ sériques au moment où l'immunité spécifique est maximale, nous n'avons pu établir aucune corrélation entre les taux des différentes immunoglobulines et le degré de protection des animaux vis-à-vis de la souche virulente de *Salmonella typhimurium* (cf. tableau XXX). Cette constatation permet de souligner une fois de plus que la résistance à une dose d'épreuve de bactéries pathogènes constitue le meilleur critère d'efficacité d'un vaccin.

Si les quantités d'immunoglobulines présentes dans les sécrétions intestinales ou dans le sérum ne renseignent pas sur le degré d'immunité des souris, les variations constatées appellent quelques remarques concernant la biosynthèse de ces protéines.

L'augmentation du taux des IgA intestinales consécutive à l'immunisation par voie buccale ne devient très nette qu'après une période de latence, puisque les valeurs trouvées au dixième jour qui suit la vaccination ne sont que légèrement supérieures à celles du lot témoin non vacciné. On pourrait donc penser que la synthèse de ces immunoglobulines ne constitue pas une réponse précoce de l'organisme à l'agression bactérienne. Mais il paraît plus probable que cette diminution passagère des IgA intestinales résulte d'une mobilisation massive des anticorps disponibles. D'autre part, s'il est actuellement démontré que la source principale d'IgA est représentée par les plasmocytes de la muqueuse digestive, il n'existe pas de parallélisme entre le taux d'IgA présentes dans les sécrétions et le nombre des plasmocytes à IgA décelables dans les muqueuses voisines par les techniques d'immunofluorescence (319). Il semble donc que l'immunité cellulaire tient une place prépondérante dans les réactions locales de défense contre l'infection bactérienne et que les immunoglobulines n'interviennent que pour rendre les bactéries pathogènes sensibles à la phagocytose et à la lyse par les macrophages. Cependant, nos résultats montrent que la protection la plus efficace et la plus durable est celle qui résulte des phénomènes immunitaires spécifiques. Il importe donc, comme l'ont déjà souligné STERN (387) et GERMANIER (466) que l'étude des facteurs de protection soit effectuée au delà du quinzième jour qui suit la vaccination, surtout si cette dernière est faite à l'aide de bactéries vivantes.

Les variations des IgA et des IgG sériques prouvent que la vaccination entérale entraîne également une stimulation du système immunitaire général. Cette amplification de la réponse résulterait selon BAZIN (37), soit d'une migration des immunocytes ou des immunoglobulines d'origine intestinale vers les tissus périphériques, soit encore d'une pénétration de l'information antigénique dans ces tissus. Il est intéressant de noter que l'augmentation des IgA et des IgG sériques est plus nette avec le vaccin vivant capable de se multiplier et de diffuser hors du tractus digestif.

D'après les résultats que nous avons obtenus la vaccination n'entraîne aucune modification significative du taux des IgM sériques qui s'est révélé extrêmement bas. Quant aux sécrétions intestinales, nous n'avons pas pu y déceler la présence de ces protéines. Nos observations sont donc légèrement différentes de celles de DUSHKIN (463) puisque ce dernier a trouvé de faibles quantités d'IgM dans les sécrétions intestinales de la souris, sans pouvoir toutefois mettre en évidence une variation de leur concentration après vaccination par voie orale à l'aide d'une souche vivante d'Escherichia coli.

Nous n'avons pas recherché l'influence de l'administration par voie buccale d'une dose de rappel sur le taux des immunoglobulines. Toutefois, les animaux qui ont survécu à l'ingestion d'une dose d'épreuve de bactéries pathogènes peuvent être considérés comme ayant été soumis à une nouvelle stimulation antigénique. On observe chez eux une augmentation très importante des IgA et des IgG intestinales. Il est intéressant de noter que la réaction observée chez les souris qui avaient préalablement reçu le vaccin vivant est beaucoup plus importante que celle des animaux vaccinés à l'aide des bactéries inactivées. Seuls les animaux ayant reçu le vaccin vivant présentent en effet une augmentation très nette des immunoglobulines sériques.

CONCLUSIONS GENERALES

L'étude des variations du taux des immunoglobulines intestinales et sériques chez la souris Balb/c vaccinée par voie orale contre Salmonella typhimurium nous a amenés à rechercher dans un premier temps les conditions optimales d'immunisation.

Nos résultats montrent que la meilleure protection contre une dose d'épreuve de bactéries pathogènes est obtenue après une vaccination quotidienne répétée pendant cinq jours consécutifs.

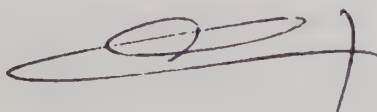
Cependant le degré d'immunité observé varie considérablement en fonction de la nature du vaccin utilisé. Lorsque ce dernier est constitué par la bactérie pathogène (souche C5S) inactivée par la chaleur, on ne constate qu'une prolongation de la durée moyenne de survie des animaux éprouvés, les taux de survie n'étant significatifs que dans le cas où la dose d'épreuve est relativement faible. En revanche, chez les animaux vaccinés à l'aide d'un mutant avirulent vivant (souche M 206), le pourcentage des survivants est important. Une fraction antigénique isolée à partir du surnageant de culture de ce mutant s'est montrée également capable de protéger efficacement la souris.

Dans tous les cas, les résultats de la vaccination par voie buccale se sont révélés identiques ou supérieurs à ceux de la vaccination intrapéritonéale pratiquée en parallèle.

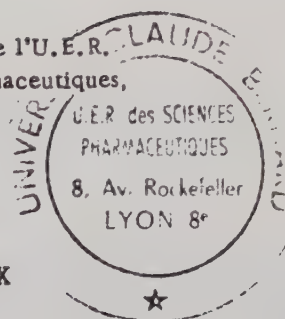
Les dosages des immunoglobulines font apparaître, chez les animaux, une nette augmentation des IgA et des IgG₁ intestinales, ainsi qu'un léger accroissement du taux des IgG₂ sériques entre le dixième et le trentième jour qui suivent la vaccination.

Bien que ces variations soient plus marquées chez les animaux ayant reçu le vaccin vivant, on ne peut établir aucune corrélation entre les taux d'IgM, d'IgA, d'IgG₁ ou d'IgG₂ et le degré de protection des souris vis-à-vis de la souche pathogène.

Le Président de la Thèse :



Vu, le Directeur de l'U.E.R. CLAUDE BERNARD
des Sciences Pharmaceutiques,



L. ODDOUX

Vu et permis d'imprimer

LYON, le 16 janvier 1976

Le Président de l'Université Claude-Bernard,

D. GERMAIN



B I B L I O G R A P H I E

- 1 - ADINOLFI A.M. - Serological properties of γ A antibodies to E.coli. Present in human colostrum.
- Immunology, 1966, 10, (517-526).
- 2 - AGARWAL S.C. and GANGULY N.K. - Experimental oral immunization with L-forms of vibrio cholerae.
- Infect. Immun., 1972, 5, (31-34).
- 3 - AIUTI F., VAN FURTH R., TURBESSI G. and RICCI G. - Presenza e sintesi delle Ig nei tessuti degli apparati gastro enterico e respiratorio, nella mucosa congiuntivale, vaginale e nella cute.
- Progr. Immunobiol. Stand., 1970, 4, (297-307).
- 4 - AKAO Y., SASAGAWA A., SHIGA S. and KONO R. - Comparative studies on the mode of neutralization reaction of poliovirus type 2 with sérum IgG and secretory IgA from mother's milk and fecal extracts.
- Jap. J. Med. Sci. Biol., 1971, 24, (135-152).
- 5 - ALLEN W.D. and PORTER P. - The demonstration of Ig in porcine intestinal tissue by immunofluorescence with observation on the effect of fixation.
- Immunology, 1970, 18, (797).
- 6 - ALLEN W.D. and PORTER P. - Localization by immunofluorescence of secretory component and IgA in the intestinal mucosa of the Young Pig.
- Immunology, 1973, 24, (365-373).
- 7 - ALLEN W.D. and PORTER P. - The relative distribution of IgM and IgA cells in intestinal mucosa and lymphoid tissue of the unweaned pig and their significance in ontogenesis of secretory immunity.
- Immunology, 1973, 24, (493-501).
- 8 - ALLEN W.D., SMITH C.G. and PORTER P. - Localization of intracellular IgA in porcine intestinal mucosa using enzyme-labelled antibody.
- Immunology, 1973, 25, (55-69).
- 9 - ANDERSEN S.B., GLENERT J. and WALLEVIK K. - Gamma globulin turnover and intestinal degradation of gamma globulin in the dog.
- J. Clin. Invest., 1963, 42, (1873-1881).
- 10 - ANDRE C., BAZIN H. and HEREMANS J.F. - Influence of repeated administration of antigen by the oral route on specific antibody producing cells in the mouse spleen.
- Digestion, 1973, 9, (166-175).
- 11 - ANDREW Y., SILVERMAN, YASUO YAGI, DAVID PRESSMAN, ROSE R., ELLISON and DOUGLAS C. TORMEY - Monoclonal IgA and IgM in the serum of a single patient (S.C.). III - Immunofluorescent identification of cells producing IgA and IgM.
- J. Immunol., 1973, 110, (350-353).

- 12 - ANSALDI N., MUSSO A., MARENGO M.L. and SANTINI B. - Duodenal immunoglobulin levels in the first two years of life.
- Biomedicine, 1973, 19, (435-437).
- 13 - ARCHER J.R. and ROWLEY D. - A quantitative comparison of the antigenic structure of a virulent and on avirulent strain of salmonella typhimurium.
- Immunology, 1969, 17, (551-558).
- 14 - ARGYRIS B.F. - Rôle of macrophages in immunological maturation.
- The J. of Exp. Med., 1968, 128, (459-467).
- 15 - ASOFSKY A., SMALL P.A. - Colostral IgA synthesis in vitro of T chains by rabbit mammary gland.
- Science, 1967, 158, (932).
- 16 - ASOFSKY R. and HYLTON M.B. - Secretory IgA synthesis in germ free and conventionally reared mice.
- Fed. Proc., 1968, 27, (617).
- 17 - ASQUITH P., THOMPSON R.A. and COOKE W.T. - Quantitation of secretory IgA in the serum of patients with gastrointestinal disease.
- GUT., 1970, 11, (368-369).
- 18 - ATKINS A.M., SCHOFIELD G.C. and REEDERS T. - Studies on the structure and distribution of IgA containing cells in the gut of the pig.
- J. Anat. 1971, 109, (385).
- 19 - AUZINS I. and ROWLEY D. - The response to Salmonella typhimurium antigens by two different strains of mice.
- Immunology, 1969, 17, (579-585).
- 20 - AXELSEN N.H. and BOCK E. - Identification and quantitation of antigens and antibodies by means of quantitative immunoelectrophoresis.
- J. of Immunological Methods, 1972, 1, (109-121).
- 21 - BACON G.A., BURROWS T.W. and YATES M. - The effects of biochemical mutation on the virulence of Bacterium typhosum : The induction and isolation of mutants.
- Brit. J. Exp. Path., 1951, 31, (703-713).
- 22 - BACON G.A., BURROWS T.W. and YATES M. - The effects of biochemical mutation on the virulence of Bacterium typhosum : The virulence of mutants.
- Brit. J. Exp. Path., 1951, 31, (714-724).
- 23 - BARBER C. et EYLAN E. - Immunochimie de Salmonella typhimurium, variations de la fraction protéique de l'Ag somatique.
- Rev. Immunol., 1972, 36, (1-13).
- 24 - BARBER C., EYLAN E. and HEIBER R. - The protective role of proteins from Salmonella typhimurium in infection of mice with their natural pathogen.
- Rev. Immunol., 1972, 36, (77-81).
- 25 - BARBIERI (de) A., TASSI C.G., CROVARI P., and G. CHIAPPINO - Research on the oral antityphoid immunization in mice and its mechanism of action.
- Prog. Immunobiol. Stand., 1970, 4, (386-388).
- 26 - BARON L.S. and FORMAL S.B. - Immunization studies with living vaccine of Salmonella typhimurium.
- Proc. Soc. Exp. Biol. (N.Y.), 1960, 104, (565-567).

- 27 - BAUR S., KOO N. and TAYLOR K. - The immunoglobulin class of auto antibody containing cells in the gastric mucosa.
- Immunology, 1970, 19, (891-894).
- 28 - BAZIN H. - Les Ig de la souris. I - Obtention des immunosérums spécifiques leur correspondant. - Ann. Inst. Pasteur, 1966, 111, (544-560).
- 29 - BAZIN H. - Les Ig de la souris. II - Etudes des anticorps synthétisés dans les différentes classes d'immunoglobulines en réponse à l'injection de deux antigènes protéiques solubles. - Ann. Inst. Pasteur, 1967a, 112, (162-172).
- 30 - BAZIN H. and MALET F. - The metabolism of different Ig classes in irradiated mice. I - Catabolism. - Immunology, 1969, 17, (345-364).
- 31 - BAZIN H. - L'immunité intestinale. - Path. Biol., 1970, 18, (1101-1106).
- 32 - BAZIN H. - L'immunité humorale au niveau de l'intestin.
- Acta Gastro ent. belg., 1970, 33, (846-854).
- 33 - BAZIN H., LEVI G. and DORIA G. - Predominant contribution of IgA antibody-forming cells to an immune response detected in extra intestinal lymphoid tissues of germ-free mice exposed to antigen by the oral route. - J. Immunol., 1970, 105, (1049-51).
- 34 - BAZIN H. - Role of the gut in the metabolism of IgA in normal and letally irradiated mice. - Proc. IV int. Congr. Radiobiol., Evian, 1970.
- 35 - BAZIN H., MALDAGUE P. and HEREMANS J.F. - The metabolism of different immunoglobulin classes in irradiated mice. Role of the gut. - Immunology, 1970, 18, (361-368).
- 36 - BAZIN H., MALDAGUE P., SCHONNE E., CRABBE P.A., BAUDON H. and HEREMANS J.F. - The metabolism of different immunoglobulin classes in irradiated mice. V - Contribution of the gut to serum IgA levels in normal and irradiated mice.
- Immunology, 1971, 20, (571-595).
- 37 - BAZIN H., ANDRE C. et HEREMANS J.F. - Réponses immunologiques induites par voie orale. - Ann. Immunol., 1973, 124c, (253-272).
- 38 - BAZZI C., CATTANEO R., MIGNONE V. and FARINA M.V. - Further observations on immunoglobulins of external secretions. - Progr. Immunobiol. Stand., 1970, 4, (333-335).
- 39 - BELLANTI J.A. - Biologic significance of the secretory γ A immunoglobulins.
- Pediatrics, 1971, 48, (715-729).
- 40 - BENNICH L., KARLSSON C. - L.K.B. 2117 multiphor. II - Procedures for immunoelectrophoresis and immunodiffusion. - Application Note LKB 2117, 401, 1973.
- 41 - BENVENISTE J., LESPINATS G. and SALOMON J.C. - Serum and secretory IgA in axinic and holoxinic mice. - J. Immunol., 1971, 107, (1656-1662).
- 42 - BERGER R.E., AINBENDER H.L., HODES, ZEER H.D. and HEVIZY M.M. - Demonstration of IgA poliantibody in saliva duodenal fluid and urine. - Nature, 1967, 214, (420-422).
- 43 - BERNIER G.M., TOMINAGA K., EASLEY C.W. and PUTNAM F.W. - Structural studies of Ig. II - Antigenic and chemical properties of γ A myeloma globulins.
- Biochemistry, 1965, 4, (2072-2081).
- 44 - BERSTEIN I.D. and OVARY Z. - Absorption of antigens from the gastro intestinal tract. - Int. Arch. Allergy, 1968, 33, (521-527).
- 45 - BESREDKA A. - Local immunization. - Williams and Wilkins, 1927, Ed. Baltimore, Maryland.

- 46 - BHASKARAN K. and SINHA V.B. - Attenuation of virulence of *Vibrio cholerae*.
- J. Hyg. (Lond.) 1967, 65, (135-148).
- 47 - BHATTACHARYA P., NARAYANASWAMI A. and MUKERJEE S. - Production of antitoxic immunity by live oral cholera vaccine. - J. Bact., 1968, 95, (255-256).
- 48 - BIENENSTOCK J. - Immunoglobulins of the hamster. II - Characterization of the γ A and other immunoglobulins in serum and secretions. - J. Immunol., 1970, 104, (1228).
- 49 - BIENENSTOCK J. and STRAUSS H. - Evidence for synthesis of human colostral γ A as IIS dimer. - J. Immunol., 1970, 105, (274).
- 50 - BIENENSTOCK J. and DOLEZEL J. - Peyer's patches : lack of specific antibody-containing cells after oral and parenteral immunization.
- J. Immunol., 1971, 106, (938-945).
- 51 - BIENENSTOCK J. and PEREY D.Y.E. - Immune mechanisms of mucosal resistance.
- Med. Clin. N. Amer., 1972, 56, (391-402).
- 52 - BIENENSTOCK J., GAVLDIE J. and PEREY D.Y.E. - Synthesis of IgG, IgA, IgM by chicken tissues : Immunofluorescent and C^{14} amino acid incorporation studies.
- J. Immunol., 1973, 111, (1112-1118).
- 53 - BISTANY T.S., TOMASI T.B. - Serum and secretory Ig from the rat.
- Immunochemistry, 1970, 7 (453-460).
- 54 - BLOTH B. - Purification, antibody activity and ultra structure of secretory and high polymer IgA. - Acta path. Microbiol. Scand., 1970, 78B (226-232).
- 55 - BLOTH B. and SVEHAG S.E. - Further studies on the ultrastructure of dimeric IgA of human origin. - J. of Exp. Med., 1971, 133, (1035-1042).
- 56 - BOURNE F.J. - IgA immunoglobulin from porcine serum.
- Biochem. Biophys. Res. Commun, 1969, 36, (138).
- 57 - BOURNE F.J., HONOUR J.W., PICKUP J. - Natural antibodies to *Escherichia coli* in the pig. - Immunology, 1971, 20, (433-436).
- 58 - BOURNE F.J., PICKUP J and HONOUR J.W. - Intestinal immunoglobulins in the pig.
- Biochem. Biophys. Acta, 1971, 229, (18-25).
- 59 - BRANDTZAEG I., FJELLANGER and GJERULDSSEN S.T. - Localization of Ig in human nasal mucosa. - Immunochemistry, 1967, 4, (57).
- 60 - BRANDTZAEG P. - Glandular secretion of immunoglobulins.
- Acta Path. Microbiol. Scand., 1968, 74, (624).
- 61 - BRANDTZAEG P., FJELLANDER I. and GJERULDSSEN S.T. - Adsorption of immunoglobulin A onto oral bacteria in vivo. - J. Bact., 1968, 96, (242-249).
- 62 - BRANDTZAEG P. - A new antigenic determinant of secretory IgA.
- Acta Path. Microbiol. Scand., 1969, 77, (334).
- 63 - BRANDTZAEG P. - Unfolding of human secretory IgA.
- Immunochemistry, 1970, 7, (127).
- 64 - BRANDTZAEG P. - Human secretory immunoglobulins. II - Salivary secretions from individuals with selectively excessive or defective synthesis of serum immunoglobulins. - Clin. Exp. Immun., 1971, 8, (69-85).

- 65 - BRANDTZAEG P. - Human secretory immunoglobulins. VI - Association of free secretory piece with serum IgA in vitro. - Immunology, 1971, 21, (323-331).
- 66 - BRANDTZAEG P. - Human secretory immunoglobulins. V - Occurrence of secretory piece in human serum. - J. Immunol., 1971, 106, (318-323).
- 67 - BRANDTZAEG P. - Human secretory immunoglobulins. III - Immunochemical and physicochemical studies of secretory IgA and free secretory piece.
- Acta Patho. Microbiol., Scand., 1971, section B 79, (165-188).
- 68 - BRANDTZAEG P. - Human secretory immunoglobulins. IV - Quantitation of free secretory piece. - Acta Path. Microbiol. Scand., 1971, section B 79, (189-203).
- 69 - BRANDTZAEG P. - Human secretory immunoglobulins. VII - Concentration of parotid IgA and other secretory proteins in relation to the rate of flow and duration of secretory stimulus. - Arch. Oral Biol., 1971, 16, (1295-1310).
- 70 - BRANDTZAEG P. - Intestinal aspects of local immunity.
- Scand. J. Gastroenterol., 1972, suppl. 16, (7-9).
- 71 - BRANDTZAEG P. - Evaluation of immunofluorescence with artificial sections of selected antigenicity. - Immunology, 1972, 22, (177-183).
- 72 - BRANDTZAEG P. - Two types of IgA immunocytes in man.
- Nature New Biology, 1973, 243, (142-143).
- 73 - BRANDTZAEG P. - Structure, synthesis and external transfer of mucosal immunoglobulins. - Ann. Immunol. Inst. Pasteur, 1973, 124c, (417-438).
- 74 - BREUEL H.P. - Lokale Immunisierung mit nicht vermehrungsfähigen Mikroorganismen oder ihren Antigenen.
- Literatur-Dokumentation, Reihe 4 Gustave Fischer Verlag, Stuttgart, 1969.
- 75 - BROWN W.R., NEWCOMB R.W. and ISHIZAKA K. - Proteolytic degradation of exocrine and serum immunoglobulins. - J. Clin. Invest., 1970, 49, (1374-1380).
- 76 - BRUCKNER G. - Über Orale Immunisierungsversuche.
- Zschr. f. Immunföschg., 1911, 8, (439).
- 77 - BRUS I., SIEGEL H., YAMAGUCHI N. and JERSY GLASS G.B. - Immunoglobulins IgA and IgG in gastric mucosa of patients with atrophic gastritis.
- Scand. J. Gastroenterol., 1968, 3, (43-57).
- 78 - BUISSIÈRE J. - Perfectionnement du tube d'Ivan Hall pour l'étude en série de la croissance et de la physiologie des bactéries. - C.R.Acad.Sci., 1972, 274, (1426-29).
- 79 - BUISSIÈRE J. et NARDON P. - Une microméthode d'identification des bactéries. I - Intérêt de la quantification des caractères biochimiques.
- Ann. Inst. Pasteur, 1968, 115, (218-231).
- 80 - BULL D.M., BIENENSTOCK J. and TOMASI T.B. - Studies on human intestinal IgA.
- Gastroenterology, 1971, 60, (370-380).
- 81 - BURDON D.W. - Immunoglobulins of normal human urine and urethral secretions.
- Immunology, 1971, 21, (363-368).
- 82 - BURDON D.W. - The bactericidal action of IgA.
- J. Med. Microbiol., 1973, 6, (131-139).

- 83 - BURROWS W. and HAVENS I. - Studies on immunity to Asiatic cholera, absorption of immune globulin from bowel, and its excretion in urine and feces of experimental animals and human volunteers.
- J. Infect. Dis., 1948, 82, (231-250).
- 84 - BUSE A. - Orale Immunisierung mit nicht vermehrungsfähigen Mikroorganismen oder Ihren Antigenen. 4 Mitt : Serum antikörper der Maus nach spezifischer Impfung gegen Salmonellen-Enteritis. - Zbl. Bakt. I. Orig., 1967, 204, (221).
- 85 - BUTLER J.E. and MAXWELL C.F. - Preparation of bovine immunoglobulins and free secretory component and their specific antisera. - J. DAIRY SCI, 1972, 55, (151-64).
- 86 - BUTLER J.E., MAXWELL C.F., PIERCE C.S., HYLTON M.B., ASOFSKY R. and KIDDY C.A. - Studies on the relative synthesis and distribution of IgA and IgG in various tissues and body fluids of the cow.
- J. Immunol., 1972, 109, (37-46).
- 87 - CAMERON J. - Responses induced in mice by injection of mouse-virulent strains of Escherichia coli. - Progr. Immunobiol. Stand., 1971, 15, (65-72).
- 88 - CARO (De) M., SAMARANI E. - Ricerche e controlli sui vaccini antitifici per via orale. - Progr. Immunobiol. Stand., 1970, 4, (369-371).
- 89 - CARRAZ H. et YAVORDIOS D. - Vaccinothérapie transmuqueuse polyvalente et immunité locale. - Rev. Inst. Pasteur Lyon, 1973, 6, (45-53).
- 90 - CASTEIGNE P., CAMBIER J., SCHULLER G. - Dosage des protéines totales et de certaines globulines du liquide céphalo-rachidien : application de l'analyse automatique aux techniques de fractionnement chimique. I - Dosage des protéines totales du liquide céphalo-rachidien.
- Rev. Franc. Etudes Clin. Biol., 1965, 10, (529-533).
- 91 - CEBRA J.J. and ROBBINS J.B. - Gammaglobulin A - Immunoglobulin from rabbit colostrum. - J. Immunol., 1966, 97, (12-24).
- 92 - CEBRA J.J. - Immunoglobulins and immunocytes. - Bact. Rev., 1969, 33, (159-171).
- 93 - CERF M., HIRSCH-MARIE H., HANSEN M., HUSSON J.M. and DEBRAY C. - Essai d'étude quantitative de l'IgA intestinale au cours de divers états pathologiques.
- Arch. Fr. Mal. App. Dig., 1972, 61, (641-648).
- 94 - CHUTTANI C.S., PRAKASH K., VERGESE A., GUPTA P., CHAWLA R.K., GROVER N. and AGARWAL D.S. - Ineffectiveness of an oral killed typhoid vaccine in a field trial.
- Bull. WHO, 1973, 48 (756-757).
- 95 - CHVOSTEK F. - Die Immunisierung per os. - Wien. Klin. Wschr., 1908, (453).
- 96 - CLARKE M.H.G. and FREEMAN T. - Quantitative immunoelectrophoresis of human serum proteins. - Clin. Sci., 1968, 35, (403).
- 97 - CLEMENTE F., RIBEIRO T., FIGARELLA C. and SARLES H. - Albumin, IgG and IgA in normal adult human pancreatic juice.
- Clin. Chim. Acta, 1971, 33, (317-324).
- 98 - COE J.E. - Studies on IgA of the Guinea-Pig. - Immunology, 1972, 22, (333-345).
- 99 - COMOGLIO P.M. and GUGLIELMONE R. - Immunohistochemical study of IgA transepithelial transfert into digestive tract secretions in the mouse.
- Immunology, 1973, 25, (71-79).

- 100 - CONNOR A.F. - Immunoglobulin levels for maternal and foetal serum. Amniotic fluid and foetal gastric juice in normal pregnancy.
- Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci., 1970, 48, (691-693).
- 101 - COOPER G.N., THONARD J.C., CROSBY R.L. and DALBOW M.H. - Immunological responses in rats following antigenic stimulation of peyer's patches.
- Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci., 1968, 46, (407-414).
- 102 - CORNELL R., WALKER W.A. and ISSELBACHER K.J. - Small intestinal absorption of horseradish peroxidase. - Lab. Invest., 1971, 25, (42-48).
- 103 - CRABBE P.A., CARBONARA A.O. and HEREMANS J.F. - The normal human intestinal mucosa as a major source of plasma cells containing γ A Ig.
- Lab. Invest., 1965, 14, (235-248).
- 104 - CRABBE P.A. and HEREMANS J.F. - The distribution of Ig containing cells along the human gastrointestinal tract. - Gastroenterology, 1966, 51, (305-326).
- 105 - CRABBE P.A. and HEREMANS J.F. - Etude immunohistochimique des plasmocytes de la muqueuse intestinale humaine normale.
- Rev. Franç. Etudes Clin. Biol., 1966, 11, (484-487).
- 106 - CRABBE P.A. and HEREMANS J.F. - Selective IgA deficiency with steatorrhea.
- Amer. J. Med., 1967, 42, (319).
- 107 - CRABBE P.A., BAZIN H., EYSEN H. and HEREMANS J.F. - The normal microbial flora as a major stimulus for proliferation of plasma cells synthesising IgA in the gut.
- Int. Arch. Allerg., 1968, 34, (362).
- 108 - CRABBE P.A. - Le tissu lymphoïde des muqueuses gastro-intestinales humaines.
- Presse Méd., 1968, 76, (1734).
- 109 - CRABBE P.A., NASH D.R., BAZIN H., EYSEN H. and HEREMANS J.F. - Antibodies of the IgA type in intestinal plasma cells of germ free mice after oral or parenteral immunization with ferritin.
- J. Exp. Med., 1969, 130, (723).
- 110 - CRABBE P.A., NASH D.R., BAZIN H., EYSEN H. and HEREMANS J.F. - Immunohistochemical observations on lymphoid tissues from conventional germ free mice.
- Lab. Invest., 1970, 22, (448-457).
- 111 - CRABBE P.A., NASH D.R., BAZIN H., EYSEN H. and HEREMANS J.F. - Studies on the Ig of the mouse intestinal secretions.
- Progr. Immunobiol. Stand., 1970, 4, (308-311).
- 112 - CRAIG S.W. and CEBRA J.J. - Peyer's patches : An enriched source of precursors for IgA- producing immunocytes in the rabbit.
- J. Exp. Med., 1971, 134, (188-200).
- 113 - CRANDALL R.B., CEBRA J.J., and CRANDALL C.A. - The relative proportions of IgG, IgA and IgM containing cells in rabbit tissues during experimental trichinosis.
- Immunology, 1967, 12, (147-158).
- 114 - CREACH O., RICHARD M., PORTALIER R., FOURNIER J.M. et FONTANGES R. - Isolement et caractérisation d'un antigène vaccinant présent dans le surnageant de culture de *Yersinia pestis* (souche EV-40).
- C.R. Acad. Sc. Paris, 1973, 276 D, (2919-2922).

- 115 - CURRY J.H. - In the proceeding of a conference on the secretory immunologic system., 1969 Vero Beach, Florida, National Institute of child Health and Human Development. p. 16, Dayton, Sma II, Chanock, Kaufman Tomasi, ed.
- 116 - CURTAIN C.C., ANDERSON N. - Immunocytochemical localization of the ovine immunoglobulins AgA, IgG₁, IgG₁-A and IgG₂. Effect of gastro intestinal parasitism in the sheep. - Clin. Exp. Immun., 1971, 8, (151-162).
- 117 - CURTIS J., BOURNE F.J. - Immunoglobulin quantitation in sow serum colostrum and milk and the serum of young pigs. - Biochim.Biophys.Acta, 1971, 236, (319-332).
- 118 - CVJETANOVIC B., MEL D.M. and FELSENFELD O. - Study of live typhoid vaccine in chimpanzees. - Bull. O.M.S., 1970, 42, (499-507).
- 119 - DALE G., LATNER A.L. - Polyacrylamide gel electrophoresis after isoelectric focusing of proteins. - Prot. Biol. fluids, 1969, (427).
- 120 - DAMJANDOVIC V. - Stability problem in the standardization of live oral Shigella vaccine. - Progr. Immunobiol. Stand., 1971, 15, (161-166).
- 121 - DAVIS B.J. - Disc electrophoresis. II - Method and application to human serum proteins. - Ann. N.Y. Acad. Sci., 1964, 121, (404).
- 122 - DENCHEV V., TRIFONOVA A., JELEVA M., DUNCHEVA S., JAAJANOVA V., DIMITROVA Z. and KOVACHEV P. - Immunity against dysentery after enteral immunization with live vaccine. - Acta Microbiol.Acad. Sci. Hung., 1974, 21, (71-74).
- 123 - DENCHEV V., JELEVA M. and DUNCHEVA S.T. - Human immunization with killed cholera vaccine. - Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung., 1974, 21, (209-212).
- 124 - DEWAR J.H., LATNER A.L. - Immunological technique for identifying protein areas in gel slabs. - Clin. Chim. Acta, 1970, 6, (166).
- 125 - DOLEZEL J., BIENENSTOCK J. - Immune response of the hamster to oral and parenteral immunization. - Cell. Immunol., 1971, 2, (326-334).
- 126 - DOLEZEL J., BIENENSTOCK J. - γ A and non γ A immune response after oral and parenteral immunization of the hamster. - Cell. Immunol., 1971, 2, (458-468).
- 127 - DOMINGO P. - Sur l'immunisation antityphoïdique par voie buccale. - C.R. Soc. Biol., 1932, 110, (733).
- 128 - DOORMASHKIN R.R., VIRELLA G., PARKHOUSE R.M.E. - Electron microscopy of human and mouse myeloma serum IgA. - J. Mol. Virol., 1971, 56, (207-208).
- 129 - DUNCAN J.R., WILRIE B.N., HIESTAND F. and WINTER A.J. - The serum and secretory immunoglobulins of cattle. Characterization and quantitation. - J. Immunol., 1972, 108, (965-976).
- 130 - DUPONT H.L., HORNICK R.B., DWKINS A.T., SNYDER M.J. and FORMAL S.B. - The response of man to virulent Shigella flexneri 2a. - J. Infect. Dis., 1969, 119, (296-299).
- 131 - DUPONT H.L., FORMAL S.B., HORNICK R.B., SNYDER M.J., LIBONATI J.P. - Pathogenesis of E.coli diarrhea. - New Engl. J. Med., 1971, 285, (1-9).
- 132 - DUPONT H.L., HORNICK R.B., SNYDER M.J., DAWKINS A.T., HEINER G.G., WOODWARD T.E. Studies of immunity in typhoid fever. Protection induced by killed oral antigens or by primary infection. - Bull. O.M.S., 1971, 44, (667-672).
- 133 - DUPONT H.L., HORNICK R.B., SNYDER M.J., LIBONATI J.P., FORMAL S.B., GANGAROSA E.J. Immunity in Shigellosis : I - Response of man to attenuated strains of Shigella. - J. Infect. Dis., 1972, 125, (5-11).

- 134 - EDDIE D.S., SCHULKIND M.L. and ROBBINS J.B. - The isolation and biologic activities of purified secretory IgA and IgG anti-Salmonella typhimurium "O" antibodies from rabbit intestinal fluid and colostrum.
- J. Immunol., 1971, 106, (181-190).
- 135 - EDEBO L. and NORMANN B. - The virulence and immunogenicity of R-mutants of Salmonella typhimurium 395 MS.
- Progr. Immunobiol. Stand., 1971, 15, (22-40).
- 136 - EIDELMAN S. and DAVIS S.D. - Immunoglobulin content of intestinal mucosal plasma cells in ataxia-telangiectasia.
- Lancet, 1968, 7548, (884-886).
- 137 - EVANS E.P., OGDEN D.A., FORD C.E. and MICKLEM H.S. - Repopulation of peyer's patches in mice. - Nature, 1967, 216, (36-38).
- 138 - FAHEY J.L., UNDERLICH J. and MISHELL R. - The immunoglobulins of mice. I - Four major classes of immunoglobulins. - J. Exp. Med., 1964, 120, (243-251).
- 139 - FAHEY J.L. and Mc KELVEY E.M. - Quantitative determination of serum immunoglobulin in antibody-agar plates. - J. Immunol., 1965, 94, (84-90).
- 140 - FAHEY J.L. and BARTH W.F. - The immunoglobulins of mice. IV - Serum immunoglobulin changes following birth. - Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1965, 118, (596-600).
- 141 - FAHEY K.J. and COOPER G.N. - Oral immunization against experimental Salmonellosis I - Development of temperature sensitive mutant vaccines.
- Infect. Immun., 1970, 1, (263-270).
- 142 - FAHEY K.J. and COOPER G.N. - Oral immunization in experimental Salmonellosis. II - Characteristics of the immune response to temperature-sensitive mutants given by oral and parenteral routes. - Infect. Immun., 1970, 2, (183-191).
- 143 - FARR R.S., DICKINSON W. and SMITH K. - Quantitative aspects of oral immunization against bovine serum albumine. - Fed. Proc., 1960, 19, (199).
- 144 - FAZEKAS de SAINT GROTH S. and DONNELLY M. - Studies in experimental influenza. III - The protective value of active immunization.
- Aust. J. Exp. Med. Sci., 1950, 28, (61-75).
- 145 - FERGUSON A. - Immunological roles of the gastro-intestinal tract.
- Scot. Med. J., 1972, 17, (111-118).
- 146 - FINKELSTEIN R.A. - The role of cholera toxin in the pathogenesis and immunology of cholera. - Tex. Rep. Biol., Med., 1969, 27, (suppl.) (181-201).
- 147 - FINKELSTEIN R.A. and HOLLINGSWORTH R.C. - Antitoxic immunity in experimental cholera : observations with purified antigens and the ligated ileal loop model.
- Infect. Immun., 1970, 1, (464-467).
- 148 - FINKELSTEIN R.A. and HOLLINGSWORTH R.C. - Antitoxic immunity in experimental cholera : observations with purified antigens and the rat foot edema model.
- Infect. Immun., 1970, 1, (468-473).
- 149 - FONTANGES R. et FOURNIER J.M. - L'immunisation par aérosol. I - Technologie de la vaccination. - Lyon Pharmaceutique, 1974, 25, (9-31).
- 150 - FONTANGES R. et FOURNIER J.M. - L'immunisation par aérosol. II - Les différentes formes d'immunité. - Lyon Pharmaceutique, 1974, 25, (415-436).

- 151 - FORMAL S.B., LABREC E.H., KENT T.H. and FALKOW S. - Abortive intestinal infection with an E.coli-Shigella flexneri hybrid strain.
- J. Bact., 1965, 89, (1374-1382).
- 152 - FORMAL S.B., LABREC E.H., PALMER A., FALKOW S. - Protection of monkeys against experimental shigellosis with attenuated vaccines.
- J. Bact., 1965, 90, (63-68).
- 153 - FORMAL S.B., KENT T.H., MAY H.C., PALMER A., FALKOW S. and LABREC E.H. - Protection of monkeys against experimental shigellosis with a living attenuated oral polyvalent dysentery vaccine. - J. Bact., 1966, 92, (17-21).
- 154 - FORMAL S.B., LABREC E.H., HORNICK R.B., DU PONT H.L. and SNYDER M.J. - Attenuation of strains of dysentery bacilli. - Progr. Immunobiol.Stand., 1971,15, (73).
- 155 - FOURNIER J.M., TESSANDIER G., FONTANGES R. - Immunisation du singe cynocéphale par aérosols de virus grippal inactivé lyophilisé. Etude de la réponse sérique et sécrétoire bronchique. - First International Congress on Aerosols in Medecine, WIEN, 1973, 19-21 Septembre.
- 156 - FRANEK F., BRUMMELOVA V. and SKYVARIL F. - Isolation and characterization of κ and λ chains of normal γ G immunoglobulin.
- Biochim. Biophys. Acta, 1968, 160, (321-332).
- 157 - FRANKLIN R.M., KENYON K.R. and TOMASI T.B. - Immuno histologic studies of human lacrymal gland : localisation of immunoglobulin secretory component and lactoferrin. - J. Immunol., 1973, 110, (984-992).
- 158 - FRETER R., GANGAROSA E. - Oral immunization and production of coproantibodies in human volunteers. - J. Immunol., 1963, 91, (724).
- 159 - FUBARA E.S. and FRETER R. - Availability of locally synthesized and systemic antibodies in the intestine. - Infect. Immun., 1972, 6, (965-981).
- 160 - FUBARA E.S. and FRETER R. - Protection against enteric bacterial infection by secretory IgA antibodies. - J. Immunol., 1973, 111, (395-403).
- 161 - FURNESS G. and ROWLEY D. - Transduction of virulence within the species Salmonella typhimurium. - J. Gen. Microbiol., 1956, 15, (140-145).
- 162 - GELZAYD E.A., KRAFT S.C., KIRSNER J.B. - Distribution of immunoglobulins in human rectal mucosa. I - Normal control subjects.
- Gastroenterology, 1968, 54, (334).
- 163 - GENCO R.J., YECIES L. and KARUSH F. - The immunoglobulin of equine colostrum and parotid fluid. - J. Immunol., 1969, 103, (437-444).
- 164 - GENCO R.J. and TAUBMAN M.A. - Secretory γ A antibodies induced by local immunization. - Nature, 1969, 221, (679-689).
- 165 - GERRIE A.L. and MARTIN L.N. - Studies on the secretory immunologic system of fowl. III - Serum and secretory IgA of the chicken.
- J. Immunol., 1973, 110, (1-8).
- 166 - GIRARD J.P., KALBERMATTEN A. - Antibody activity in human duodenal fluid.
- Europ. J. Clin. Invest., 1970, 1, (188-195).
- 167 - GIRARD J.P., MARTIN du PAN R. and TRIAU R. - Intestinal IgA antibodies in infants following oral immunization with an antigenic extract from pathogenic strain of E.coli. - Progr. Immunobiol. Stand., 1971, 15, (233-240).

- 168 - GIRARD J.P. et De KALBERMATTEN A. - ~~Dosage et propriétés anticorps~~ des immunoglobulines des secrétions duodénales de la maladie coeliaque.
- Ann. Immunol. (Inst. Pasteur), 1973, 124c, (555-565).
- 169 - GOLDBERG L.S., SHUSTER J., FUDENBERG H.H. - Gastric autoimmunity in pernicious anemia. - J. Lab. Clin. Med., 1969, 73, (249-257).
- 170 - GORZYNSKI E.A., PRIORE R.L. and NETTER E. - Effect of immunization with common enterobacterial antigen on experimental Salmonella typhimurium infection of mice.
- Immunol. Comm., 1972, 1, (123-130).
- 171 - GRABAR P., WILLIAMS C.A. - Méthodes permettant l'étude conjuguée des propriétés électrophorétiques et immunochimiques d'un mélange de protéines. Application au sérum sanguin. - Biochim. Biophys. Acta., 1953, 10, (193-194).
- 172 - GRABEN N. - Zur Oraln Immunisierung von Mäusen mit inaktivierten S.typhimurium bakterien im Form einer Wasser in Öl-Emulsion aus kompletten und inkompletten Freund'shen Adjuvans. - Inaug. Diss. Berlin, 1971, (s.presse).
- 173 - GRAHNEIS H. - Effectiveness of oral inactivated typhoid vaccine.
- Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung., 1974, 21, (129-133).
- 174 - GRAHNEIS H. - Successful field trials with oral killed Shigella sonnei vaccine.
- Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung., 1974, 21, (75-80).
- 175 - GUESDON J.L. and AVRAMEAS S. - An immunoenzymatic method for measuring low concentrations of antigens by single radial diffusion.
- Immunochemistry, 1974, 11, (595-598).
- 176 - HAAKENSTAD A.O., COE J.E. - The immune response in the hamster. IV - Studies on IgA. - J. Immunol., 1971, 106, (1026-1034).
- 177 - HALPERN M.S. and KOSHLAND M.E. - Novel subunit in secretory IgA.
- Nature, 1970, 228, (1276-1278).
- 178 - HALPERN M.S. and COFFMAN R.L. - Polymers formation and J chain synthesis in mouse plasmacytomas. - J. Immunol., 1972, 109, (674-680).
- 179 - HANSON L.A. - Comparative immunological studies of the immunoglobulins of human milk and of blood serum. - Int. Arch. Allerg., 1961, 18, (241).
- 180 - HATUNCEVA N.V., MIRONOVA M.V., RYAPOLOVA R.G. - Immunochemical examination of typhoid and paratyphoid vaccines prepared from envelope and O antigens.
- Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung., 1974, 21, (135-141).
- 181 - HAZENBERG B.P., HOEDEMAEKER P.H.J., NIEUWENHUIS P. and MANDENA E. - Source of IgA in jejunal secretions. - Prot. Biol. Fluids, 1968, 16, (491-497).
- 182 - HEIMER R., JONES D.W., MAURER P.H. - The immunoglobulins of sheep colostrum.
- Biochemistry, 1969, 8, (3937).
- 183 - HENRY C., FAULK W.P., KUHN L., YOFFEY J.M., FUDENBERG H.H. - Peyer's patches : immunologic studies. - J. Exp. Med., 1970, 131, (1200-1210).
- 184 - HEREMANS J.F. - Thèse Université, Louvain, 1960.
- 185 - HEREMANS J.F. - Molecular and cellular basis of antibody formation.
- Cz. Acad. Sci., 1965, (277-280).
- 186 - HEREMANS J.F. - Immunoglobulin formation and function in different tissues.
- Cur. Top. Microbiol. Immunobiol., 1968, 45, (131-203).

- 187 - HEREMANS J.F. and BAZIN H. - Antibodies induced by local antigenic stimulation of mucosal surfaces. - *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1971, 190, (268-274).
- 188 - HIRSCHAAMARIE H. - Direct measure of low-concentration immunoglobulin by the Laurell method. - *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1970, 52, (631-639).
- 189 - HONG R., POLLARA B., GOOD R.A. - A model for colostral IgA.
- *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 1966, 56, (602-627).
- 190 - HORNICK R.B., GREISMAN S.E. and WOODWARD T.E. - Typhoid fever : pathogenesis and immunologic control. - *N. Engl. J. Med.*, 1970, 283, (686-691).
- 191 - HORNICK R.B., GREISMAN S.E., WOODWARD T.E., DUPONT H.L., DAWKINS A.T., SNYDER M.J. Typhoid fever : pathogenesis and immunologic control. (2 nd part.).
- *N. Engl. J. Med.*, 1970, 283, (739-746).
- 192 - HORNICK R.B., DUPONT H.L., DAWKINS A.T., SNYDER M.J. and WOODWARD T.E. - Evaluation of typhoid fever vaccines in man.
- *Progr. Immunobiol. Stand.*, 1971, 15, (143-150).
- 193 - HOWARD B.D. - A prototype live oral cholera vaccine.
- *Nature*, 1971, 230, (97-99).
- 194 - HURLIMANN J. and ZUBER C. - In vitro protein synthesis by human salivary glands. Synthesis of salivary IgA and serum proteins. - *Immunology*, 1968, 14, (809-817).
- 195 - HURLIMANN J., WALDESBUEHL M and ZUBER C. - Human salivary immunoglobulin A. Some immunological and physicochemical characteristics.
- *Biochim. Biophys. Acta.*, 1969, 181, (393-403).
- 196 - HURLIMANN J. - Immunoglobulins synthesis and transport by human salivary glands. Immunological mechanisms of the mucous membranes.
- *Curr. Top. Path.*, 1971, 55, (69-108).
- 197 - HURLIMANN J. and DARLING H. - In vitro synthesis of IgA by salivary glands from animals of different species. - *Immunology*, 1971, 21, (101-111).
- 198 - ISTRATI G., MEITERT T., CIUFECU C., SULEA I.T., BARON E., JIPA G. - Traitement de la dysenterie bacillaire chronique par un vaccin vivant antidysenterique.
- *Arch. Roum. Path. Microbiol.*, 1973, 32, (23-33).
- 199 - IVANOFF B., CREACH O. et FONTANGES R. - Variation de l'immunité intestinale après vaccination par voie orale. I - Mise au point d'un protocole de vaccination par une bactérie pathogène tuée.
- *C.R. Travaux Scientifiques CRSSA*, 1973, Art. B38, (95-97).
- 200 - IVANOFF B., CREACH O. et FONTANGES R. - Variation de l'immunité intestinale après vaccination par voie orale. II - Vaccination par un antigène isolé du surnageant de culture de Yersinia pestis EV-40.
- *C.R. Travaux Scientifiques CRSSA*, 1973, Art. B39, (97-98).
- 201 - IVANOFF B., LAVAL F., CREACH O. et FONTANGES R. - Etude de la protection de la souris après vaccination par voie orale à l'aide d'une souche avirulente vivante de Salmonella typhimurium. - *C.R. Soc. Biol.*, 1975, Séance du 16 Déc.74 (s.presse)
- 202 - IVANOFF B., CREACH O. et FONTANGES R. - Etude de la protection de la souris après vaccination par voie orale à l'aide d'une souche pathogène tuée de Salmonella typhimurium. - *C.R. Soc. Biol.*, 1974, 168, (541-545).

- 203 - IVANOFF B., CREACH O., DELORME P., LAVAL F. et FONTANGES R. - Mise en évidence d'un antigène vaccinant dans le surnageant de culture de S.typhimurium souche M 206. - C.R. Acad. Sc., 1975, 280, (791-793).
- 204 - IVANOFF B., CREACH O. et FONTANGES R. - Point actuel de la vaccination par voie orale contre les entérobactéries. I - Technologie.
- Lyon Pharmaceutique, 1975 (sous presse).
- 205 - IYENGAR L., SELVARAJ R.J. - Intestinal adsorption of immunoglobulins by newborn infants. - Arch. Dis. Child., 1972, 47, (411-414).
- 206 - JARRETT E.E.E. and STEWART D.C. - The significance of circulating IgE. Correlation of amount of circulating reaginic antibody with cutaneous sensitivity in the rat. - Immunology, 1973, 24, (38-45).
- 207 - JOHNSON J.S. - The secretory immune system. A brief review.
- J. Infect. Dis., 1970, 121, (115).
- 208 - KAGNOFF M.F., SERFILIPPI D., and DONALDSON R.M. - In vitro kinetics of intestinal secretory IgA secretion. - J. Immunol., 1973, 110, (297-304).
- 209 - KALPAKTSOGLUO P.K., KONG R. and GOOD R.A. - The five classes of immunoglobulins in normal C3H and Balb/c mice. - Immunology, 1973, 24, (303-314).
- 210 - KAROLCEK J., RUSINKO M., DRASKOVICOVA M., MIKULKOVA M., BATCEROVA L., LUZOVA D. - Allgemeine Immunitats reaktionen bei Menschen nach Oraler Anwendung von einem Typhus - Enteroinfektstoff. - Zbl. Bakt. I. Abt. Orig., 1965, 198, (225-233).
- 211 - KATZ D.H. and PEREY D.Y.E. - Lymphocytes in peyer's patches of the mouse : analysis of the constituent cells in terms of their capacities to mediate functions of mature T and B lymphocytes. - J. Immunol., 1973, 111, (1507-1513).
- 212 - KELLER R., DWYER J.E., OH W. and D'AMODIO M. - Intestinal IgA neutralizing antibodies in newborn infants following a poliovirus immunization.
- Pediatrics, 1969, 43, (330-338).
- 213 - KELLER R. and DWYER J.E. - Studies on the neutralization of poliovirus by fecal immunoglobulins. The development of intestinal IgA antibodies following oral poliovirus immunization. - Progr. Immunobiol. Stand., 1970, 4, (316-322).
- 214 - KENNY J.F., WEINERT D.W. and GRAY J.A. - Enteric infection with E.coli 0127 in the mouse II - Failure of specific immunity to alter intestinal colonization of infants and adults. - J. Infect. Dis., 1974, 129, (10-20).
- 215 - KETIYI I., RAUSS K. and VERTENYI A. - Oral immunization against dysentery.
- Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung., 1974, 21, (81-85).
- 216 - KINNE-SAFFRAN E. - Tierversuche zur oralen Impfung gegen menschen-pathogene, Enteritis erregende Salmonellen. - Inaug. Diss. Med. Fak., Berlin, 1967.
- 217 - KINNE-SAFFRAN E., KURSCHILGEN E.M., MARQUARDSEN A. und RAETTIG H. - Orale Immunisierung mit nichtvermehrungsfähigen Mikroorganismen oder Ihren Antigenen. 9. Mitt. : Tierversuche zur Schutzimpfung gegen Infektionen durch Enteritis erregende Salmonellen. - Zbl. Bakt. I. Abt. Orig., 1968, 208, (37-58).
- 218 - KIRSCH W. - The influence of gastro-intestinal secretions on immunoglobulins from milk and serum. - Helv. Pediat. Acta, 1970, 25, (119-126).

- 219 - KNOP J., BREU H., WERNET P. and ROWLEY D. - The relative antibacterial efficiency of IgM, IgG and IgA from pig colostrum.
- Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci., 1971, 49, (405-413).
- 220 - KOBAYASHI K. - Studies on human secretory IgA comparative studies of the IgA bound secretory piece and the free secretory piece protein.
- Immunochemistry, 1971, 8, (785-800).
- 221 - KOBAYASHI K., VAERMAN J.P. and HEREMANS J.F. - Studies on human secretory IgA. II - Comparative studies on a fragment of secretory component derived from IgAS and fragments obtained by enzymatic digestion of free secretory component.
- Immunochemistry, 1973, 10, (73-80).
- 222 - KOHLER E.M. and CROSS R.F. - Feeding bacteria-free whole cell lysates of E.coli to gnotobiotic pigs and the effects of giving antisera.
- Amer. J. Vet. Res., 1971, 32, (739-748).
- 223 - KONO R., AKAO A., SASAGAWA W. and NOMURA Y. - Studies on the local immunity of intestinal tract of chickens after oral administration of Newcastle disease virus.
- Progr. Immunobiol. Stand., 1970, 4, (330-332).
- 224 - KORDES I., KORDES B., PICHL H., GANZE B. and RAETTIG H. - Orale Immunisierung mit nichtvermehrungsfähigen Mikroorganismen oder Ihren Antigenen. 12-Mitt : Immunität verschieden inaktivierter S.typhimurium Vollantigene im Mänseschutztest.
- Zbl. Bakt. I. Orig., 1971, 217, (242-253).
- 225 - KORENBLAT P.E., ROTHEBERG R.M., MINDEN P. and FARN R.S. - Immune response of human adults after oral and parenteral exposure to bovine serum albumine.
- J. Allerg., 1968, 41, (226-235).
- 226 - KRAFT S.C. and KIRSNER J.B. - Immunological apparatus of the gut and inflammatory bowel disease. - Gastroenterology, 1971, 60, (922-951).
- 227 - KRASNOPROSHINA L.I. - Comparison of oral and subcutaneous immunization against typhoid-paratyphoid fever. - Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung., 1974, 21, (151-60).
- 228 - KRIEBEL G.W., KRAFT S.C. and ROTHBERG R.M. - Locally produced antibody in human gastro intestinal secretions. - J. Immunol., 1969, 103, (1268-1275).
- 229 - KROLL J. - Immunochemical identification of specific precipitin lines in quantitative immunoelectrophoresis patterns.
- Scand. J. Clin. Lab. Invest., 1969, 24, (55).
- 230 - KUBINYI L., KISS I. and LENDVAI K.G. - Epidemiological evaluation of the efficiency of oral vaccination against enteropathogenic E.coli.
- Acta Microbiol., 1972, 19, (175-186).
- 231 - KURLOVA V.I. and MESHALOVA A.N. - Dynamique de l'intensité de l'immunité en immunisation entérale et sous-cutanée de la souris avec des vaccins typhoïdiques.
- Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol., 1972, 49, (35-40).
- 232 - LABREC E.H., HERMAN S.C., MAGNANI T. and FORMAL S.B. - Epithelial cell penetration as an essential step in the pathogenesis of bacillary dysentery.
- J. Bact., 1964, 88, (1503-1518).
- 233 - LAMY J., LAMY J., COMPIN S. et WEILL J. - Aspects théoriques et pratiques des nouvelles méthodes d'électrophorèse sur gel de polyacrylamide en gradient de pH et gradient de porosité. - Ann. Biol. Clin., 1971, 29, (125-143).

- 234 - LASCELLES A.K. and Mc DOWELL G.H. - ~~Secretion of IgA in the sheep following local antigenic stimulation.~~ - Immunology, 1970, 19, (613-620).
- 235 - LAURELL C.B. - Quantitative estimation of proteins by electrophoresis in agarose gel containing antibodies. - Anal. Biochem., 1966, 15, (45-52).
- 236 - LAWTON A.R. and MAGE R.G. - The synthesis of secretory immunoglobulins A in the rabbit. I - Evidence for synthesis as an 11S dimer. - J. Immunol., 1969, 102, (693-697).
- 237 - LAWTON A.R., ASOFSKY R. and MAGE R.G. - Synthesis of secretory IgA in the rabbit. II - Production of alpha, light and T chains by in vitro cultures of mammary tissue. - J. Immunol. 1970, 104, (388-396).
- 238 - LAWTON A.R., ASOFSKY R. and MAGE R.G. - Synthesis of secretory IgA in the rabbit. III - Interaction of colostral IgA fragments with T chain. - J. Immunol., 1970, 104, (397-408).
- 239 - LEBACQ-VERHEYDEN A.M., VAERMAN J.P. and HEREMANS J.F. - A possible homologue of mammalian IgA in chicken serum and secretions. - Immunology, 1972, 22 (165-175).
- 240 - LEBACQ-VERHEYDEN A.M., VAERMAN J.P. and HEREMANS J.F. - Quantification and distribution of chicken immunoglobulins IgA, IgM and IgG in serum and secretions. - Immunology, 1974, 27, (683-691).
- 241 - LEE C.S., and LASCELLES A.K. - Antibody producing cells in antigenically stimulated mammary glands and in the gastrointestinal tract of sheep. - Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci., 1970, 48, (in press).
- 242 - LESLIE G.A., CRANDALL R.B. and CRANDALL C.A. - Studies on the secretory immunological system of fowl. II - Immunoglobulin producing cells associated with mucous membranes. - Immunology, 1971, 21, (983-987).
- 243 - LESLIE G.A., WILSON H.R. and CLEM L.W. - Studies of the secretory immunologic system of fowl. I - Presence of immunoglobulins in chicken secretions. - J. Immunol., 1971, 106, (1441-1446).
- 244 - LEVANON Y. and ROSSETINI S.M.O. - Reagents from orally immunized animals. - Progr. Immunobiol. Stand., 1970, 4, (347-351).
- 245 - LEVINE M.M., DUPONT H.L., GANGAROSA E.J., HORNICK R.B., SNYDER M.J., LIBONATI J.P., GLASER K. and FORMAL S.B. - Shigellosis in custodial institutions. II - Clinical immunologic and bacteriologic response of institutionalized children to oral attenuated Shigella vaccines. - Am. J. Epidemiol., 1972, 96, (40-49).
- 246 - LEWIS D.M., LE ROY LAPP N. and BURRELL R. - Quantitation of secretory IgA in chronic pulmonary disease. - Amer. Rev. Resp. Dis., 1970, 101, (55-61).
- 247 - LINDE K., KELLER A., EZOLD R., BLATZ R., GERICKE B., KOCH H., KITTLICK M. and SCHMIDT S. - Live vaccines against infectious with enterobacteriaceae. Problems of selection of attenuated mutants and their genetic stability. - Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung., 1974, 21, (11-27).
- 248 - LIOTET S. and ROUCHY J.P. - Study of Ig in human tears. - Arch. Ophthal. Paris, 1970, 30, (799-808).

- 249 - MACCLELLAND D.B., FINLAYSON N.D., SAMSON R.R., NAIRN I.M., SHEARMAN D.J. - Quantitation of Ig in gastric juice by electroimmunodiffusion. - *Gastroenterology*, 1971, 60, (509-514).
- 250 - MACFARLIN D.E., STROBER W. and WALDMAN T.A. - Atoxia - telangiectasia. - *Medicine (Balt.)*, 1972, 51, (281-314).
- 251 - MACH J.P., PAHUD J.J. and IZLIKER H. - IgA with secretory piece in bovine colostrum and saliva. - *Nature*, 1969, 223, (952-954).
- 252 - MACH J.P. and PAHUD J.J. - A IgA with a sedimentation coefficient of 11S in external secretions of the bovine species. - *Experientia*, 1969, 25, (1083-1084).
- 253 - MACH J.P. and PAHUD J.J. - Identification of secretory IgA, free secretory piece and serum IgA in the ovine and canine species. - *Immunochemistry*, 1970, 7, (679).
- 254 - MACH J.P. - In vitro combination of human and bovine free secretory component with IgA of various species. - *Nature*, 1970, 228, (1278-1282).
- 255 - MACH J.P. and PAHUD J.J. - Secretory IgA a major immunoglobulin in most bovine external secretions. - *J. Immunol.*, 1971, 106, (552-563).
- 256 - MANCINI G., CARBONARA A.O. and HEREMANS J.F. - Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion. - *Immunochemistry*, 1965, 2, (235-254).
- 257 - MARGOLIS J., KENRICK K.G. - Two dimensional resolution of plasma proteins by combination of polyacrylamide disc and gradient gel electrophoresis. - *Nature*, 1969, 221, (1056-1057).
- 258 - MARWIK G., SCHMUDDE R., NEUMANN-SCHON, WETTER B. und RAETTIG H. - Oral Immunisierung mit nichtvermehrungsfähigen Mikroorganismen oder Ihren Antigenen. 8.Mitt. : Vergleichende Tierversuche zur Inhalation impfung und zur nasalen, Oralen, und rektalen schutzimpfung. - *Zbl. Bakt. I. Abt. Orig.*, 1968, 208, (26-37).
- 259 - MEDICI - The role of the IgA in endogenous bronchial defense mechanism in chronic bronchitis. - *Am. Rev. Resp. Dis.*, 1971, 103, (784-791).
- 260 - MEL D.M., TERZIN A.L. and VUKSIC L. - Studies on vaccination against bacillary dysentery. I - Immunization of mice against experimental *Shigella* infection. - *Bull. O.M.S.*, 1965, 32, (633-636).
- 261 - MEL D.M., PAPO R.G., TERZIN A.L. and VUKSIC L. - Studies on vaccination against bacillary dysentery-2-safety tests and reactogenicity studies on a live dysentery vaccine intended for use in field trials. - *Bull. O.M.S.*, 1965, 32, (637-645).
- 262 - MEL D.M., TERZIN A.L. and VUKSIC L. - Studies on vaccination against bacillary dysentery. III - Effective oral immunization against *Shigella flexneria* 2a in a field trail. - *Bull. O.M.S.*, 1965, 32, (647-655).
- 263 - MEL D.M., ARSIC B.L., NIKOLIC B.D. and RADOVANOVIC M.L. - Studies on vaccination against bacillary dysentery. IV - Oral immunization with live monotypic and combined vaccines. - *Bull. O.M.S.*, 1968, 39, (375-380).
- 264 - MEL D.M., ARSIC B.L., RADOVANOVIC M.L., KALJALOVIC R. and LITVINJENKO S. - Safety tests in adults and children with live oral typhoid vaccine. - *Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung.*, 1974, 21, (161-166).

- 265 - MEL D.M., ARSIC B.L., RADOVANOVIC M.L. and LITVINJENKO S.A. - Live oral Shigella vaccine : vaccination shedule and the effect of booster dose.
- Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung., 1974, 21, (109-114).
- 266 - MELCHERS F. - Biosynthesis transport and secretion of immunoglobulin in plasma cells. - Histochem. J., 1971, 3, (389-397).
- 267 - MESTECKY J., ZIKAN J. and BUTLER W.T. - IgM and secretory IgA : Presence of a common polypeptide chain different from light chains.
- Science, 1971, 171, (1163).
- 268 - MESTECKY J., KULHAVY R., KRAUS F.W. - Studies on human secretory immunoglobulin A. II - Subunit structure. - J. Immunol., 1972, 108, (738-747).
- 269 - MESTECKY J., ZIKAN J., BUTLER W.T. and KULHAVY R. - Studies of human secretory immunoglobulin A. III - J. chain. - Immunochemistry, 1972, 9, (883).
- 270 - MESTECKY J., SCHROHENLOHER R.E., KULHAVY R., WRIGHT P. and TOMANA M. - Site of J chain attachment to human polymeric IgA.
- Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1974, 71, (544-548).
- 271 - METSCHNIKOFF E. - Etudes sur l'immunité (4^o memoire). L'immunité des cobayes vaccinés contre le Vibrio Metschnikowii.
- Ann. Inst. Pasteur, 1891, 5, (465).
- 272 - MOCHMANN H. , OCKLITZ H.W., WEH L. and HEINRICH H. - Oral immunization with an extract of E.coli enteritidis.
- Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung., 1974, 21, (193-196).
- 273 - MOCHMANN H. and OCKLITZ H.W. - Oral immunization against enteric infections using inactivated bacteria. A review.
- Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung., 1974, 21, (3-10).
- 274 - MORISSON S.L., KOSHLAND M.E. - Characterization of the J. chain from polymeric immunoglobulins (IgA, IgM-immunological specificity primary structure).
- Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1972, 69, (124-128).
- 275 - MRUGOWSKI J. - Zur frage der zelhulären Immunität beim Menschen nach peroraler Immunisierung. - Zschr. f. Immunfshg., 1942, 102, (153).
- 276 - MUNN E.H., FEINSTEIN A. - Electronic examination of the free IgA molecules and of their complexes with antigen. - Nature, 1971, 231, (527-529).
- 277 - MURILLO G.T. - Synthesis of secretory IgA by human colostral cells.
- Southern. Med. J., 1971, 64, (1333-1337).
- 278 - MYNARD M.C., TRIAU R., VALETTE L. and DONIKIAN R. - Preparation and controls on animals of an oral TAB vaccine.
- Progr. Immunobiol. Stand., 1971, 15, (151-160).
- 279 - NADORP J.H., VOSS M., VAN MUNSTER P.J., STOELINGA G., FLENDRIG J.A., DUYS W.C. and VAN TONGEREN J.H. - IgA metabolism in control subjects, in patients with elevated IgA levels and in Patients with IgA deficiency.
- Prot. Biol. Fluids, 1971, 19, (449-453).
- 280 - NASH D.R., VAERMAN J.P., BAZIN H. and HEREMANS J.F. - Identification of IgA in rat serum and secretions. - J. Immunol., 1969, 103, (145-148).

- 281 - NASH D.R., VAERMAN J.P., BAZIN H. and HEREMANS J.F. - Comparative molecular size of mouse immunoglobulins A, in different body fluids.
- Int. Arch. Allerg., 1970, 37, (167-174).
- 282 - NEOH S.H. and ROWLEY D. - The antigens of vibrio cholerae involved in the vibriocidal action of antibody and complement.
- J. Infect. Dis., 1971, 121, (505-513).
- 283 - NEWCOMB R.W., NORMANSELL D.E. and STANWORTH (D.R.) - A structural study of human exocrine IgA globulin. - J. Immunol., 1968, 101, (905-914).
- 284 - NIEDERMEIER W., TOMANA M. and MESTECKY J. - The carbohydrate composition of J. chain from human serum and secretory IgA.
- Biochim. Biophys. Acta, 1972, 257, (527-530).
- 285 - NICOLAS J.P., BELUT D., PUPIL P. et GRILLAT J.P. - Le dosage des IgE dans différents types de manifestations allergiques.
- Ann. Méd. Nancy, 1973, 12, (1399-1402).
- 286 - OCKLITZ H.W., MOCHMANN H., SCHMIDT E.F. and HERING L. - Oral immunization of mice with a soluble protective antigen obtained from enteropathogenic serotypes of Escherichia coli. - Nature, 1967, 214, (1053-1054).
- 287 - OCKLITZ H.W., MOCHMAN H. and SCHMIDT E.F. - Laboratoriums versuche über die Möglichkeiten einer oralen Immunisierung mit einem natrium desoxycholat-Extrakt aus Dyspepsicoli Stämmen. - Abstracts fifth Intern. Congr. Infect. Dis., Vienna 31 August-5 Sept. 1970, (61-64).
- 288 - O'DALY J.A., GRAIG S.W. and CEBRA J.J. - Localization of β Markers α -chains and SC of S IgA in epithelial cells lining Lieberkühn crypts.
- J. Immunol., 1971, 106, (286-288).
- 289 - O'DALY J.A. and CEBRA J.J. - Rabbit secretory IgA. II - Free secretory component from colostrum and its specific association with IgA.
- J. Immunol., 1971, 107, (449-454).
- 290 - O'DALY J.A. and CEBRA J.J. - Chemical and physicochemical studies of the component polypeptide chains of rabbit secretory IgA.
- Biochemistry, 1971, 10, (3843-3850).
- 291 - O'DALY J.A. and CEBRA J.J. - Rabbit secretory IgA. I - Isolation of secretory component after selective dissociation of the immunoglobulin.
- J. Immunol., 1971, 107, (436-448).
- 292 - OGRA P.L. and KARZON D.T. - Immunoglobulin response in serum and secretions after immunization with live and inactivated poliovaccine and natural infection.
- New. Engl. J. Med., 1968, 279, (893).
- 293 - OGRA P.L. and KARZON D.T. - Polyvirus antibody response in serum and nasal secretions following intranasal inoculation with inactivated poliovaccine.
- J. Immunol., 1969, 102, (15-23).
- 294 - OGRA P.L. and KARZON D.T. - Distribution of poliovirus antibody in serum nasopharynx and alimentary tract following segmental immunization of lower alimentary tract with poliovaccine. - J. Immunol., 1969, 102, (1423-1430).
- 295 - de OLIVEIRA C. - Immunité locale et entérovaccins.
- Progr. Immunobiol. Stand., 1970, 4, (336).

- 296 - O.M.S. - Les vaccins buccaux contre les entérobactéries.
- Bull. O.M.S., Ser. Rapp. Technic., 1972, n° 500.
- 297 - OUDIN J. - Méthode de dosage quantitatif des protéines.
- C.R. Acad. Sci., 1946, 222, (115).
- 298 - OUTCHERLONY O. - Antigen antibody reaction in gels. IV - Types of reactions in coordinated systems of diffusion.
- Acta Path. Microbiol. Scand., 1953, 32, (231-242).
- 299 - PAHUD J.J. and MACH J.P. - Equine secretory IgA and secretory component.
- Int. Arch. Allergy, 1972, 42, (175-186).
- 300 - PANERO C., SALETTI M. and DITOMASO I. - The detection of intestinal IgA in children following oral typhoid vaccine.
- Progr. Immunobiol. Stand., 1972, 5, (369-372).
- 301 - PEARAY L. and OGRA M.D. - Immunoglobulins and resistance to viruses in the gastro-intestinal tract. - Fourth. International Symposium on Aerobiology, September 4-7, 1972, Utrecht, Netherlands.
- 302 - PERNIS B. and FERRARINI M. - The antibody secretion and immunological protection of the mucosae. - Ann. Sclavo, 1970, 12, (569-577).
- 303 - PERSHIN B.B., LEBEDEV K.A., NOVIKOVA F.A. - Application of the coonstest in studies on immune reaction to oral typhoid vaccination.
- Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung., 1974, 21, (173-180).
- 304 - PETIT J.C., GALINHA A. and SALOMON J.C. - Ig in the intestinal content of the human fetus with special reference to IgA.
- Europ. J. Immunol., 1973, 3, (373-375).
- 305 - PETRAKIS N.L., DOHERTY M., LEE R.E., SMITH S.C. and PAGE N.L. - Demonstration and implications of lysozyme and immunoglobulins in human ear wax.
- Nature, 1971, 229, (119-120).
- 306 - PHILLIPS J. (DON), SHORE S.L., MADISSON S.E., GORDON D.S. and REIMER C.B. - Comparative evaluation of commercial precipitating antisera against human IgA.
- J. Lab. Clin. Med., 1971, 77, (639-644).
- 307 - PIERCE C.W., KAPP J.A., WOOD D.D. and BENACERRAF B. - Immune response in vitro. X - Function of macrophages. - J. Immunol., 1974, 112, (1181-1189).
- 308 - PLAUT A.G. and KEONIL P. - Immunoglobulins un human small intestine fluid.
- Gastro enterologia (Basel), 1969, 56, (522).
- 309 - PLATT H.S., SEWELL B.M., FELDMAN T and SOUHAMI R.L. - Further modifications of the two dimensional electrophoretic technique of Laurell.
- Clin. Chim. Acta, 1973, 46, (419-429).
- 310 - POEN H., BALLIEUX R.E., MUL N.A.J., STOOP J.W., TEN THIJE O.J. and ZEGERS B.J.M. - Increased serum IgA in intestinal disease.
- Prot. Biol. Fluids, 1968, 16, (485-489).
- 311 - POPOVICI M., FILIPESCU S., DIMACHE G.H., CHIRESCU N., DANILA O., AVRAMESCU C., COBAN A.L. - Efficacité de la vaccination antityphoïdique par voie buccale.
- Arch. Roum. Path. Exp. Microbiol., 1973, 32, (428).

- 312 - PORTER P. - Porcine colostral IgA and IgM antibodies to E.coli and their intestinal adsorption by the neonatal piglet. - Immunology, 1969, 17, (617-626).
- 313 - PORTER P. - Transfer of immunoglobulins IgG, IgA and IgM to lacteal secretions in the parturient sow and their adsorption by the neonatal piglet.
- Biochim. Biophys. Acta, 1969, 181, (381-392).
- 314 - PORTER P., NOAKES D.E. and ALLEN W.D. - Secretory IgA and antibodies to E.coli in porcine colostrum and milk and their significance in the alimentary tract of the young pig. - Immunology, 1970, 18, (245-257).
- 315 - PORTER P. and HILL I.R. - Serological changes in immunoglobulins IgG, IgA and IgM and E.coli antibodies in the young pig. - Immunology, 1970, 18, (565-573).
- 316 - PORTER P., NOAKES D.E. and ALLEN W.D. - Intestinal secretion of immunoglobulins and antibodies to Escherichia coli in the pig.
- Immunology, 1970, 18, (909-920).
- 317 - PORTER P. and NOAKES D.E. - Immunoglobulin IgA in bovine serum and external secretions. - Biochim. Biophys. Acta, 1970, 204, (107-116).
- 318 - PORTER P. - Immunoglobulin IgA in bovine mammary secretions and serum of the neonatal calf. - Biochim. Biophys. Acta, 1971, 236, (664-674).
- 319 - PORTER P. - Immunoglobulins in bovine mammary secretions.
- Immunology, 1972, 23, (225-237).
- 320 - PORTER P., NOAKES D.E. and ALLEN W.D. - Intestinal secretion of immunoglobulins in the preminant calf. - Immunology, 1972, 23, (299-311).
- 321 - PORTER P. - Studies of porcine secretory IgA and its component chains in relation to intestinal absorption of colostral Ig by the neonatal pig.
- Immunology, 1973, 24, (163-175).
- 322 - PORTER P., KENWORTHY R., NOAKES D.E. and ALLEN W.D. - Intestinal antibody secretion in the young pig in response to oral immunization with E.coli.
- Immunology, 1974, 27, (841-852).
- 323 - PUSHKAREV I.A., VELIR L.V. and YAVORKOVKAYA E.K. - Location of IgA and IgM immunoglobulins after disc electrophoresis in polyacrylamide gel.
- Problems in Medecinal Chemistry (URSS), 1972, 18, (309-315).
- 324 - RADL J., KLEIN F., PLEUNT J.E., VAN DEN BERG, DE BRUYN A.M. and HIJMANS W. - Binding of secretory piece to polymeric IgA and IgM paraproteine in vitro.
- Immunology, 1971, 20, (843-852).
- 325 - RAETTIG H. - Die lokale Immunisierung mit inaktiviertem Antigen gegen bakterielle Darminfektionen. - Zbl.f.Bakt.I.Ref. 1, 1962, 183.
- 326 - RAETTIG H. - Orale Immunisierung mit nichtvermehrungsfähigen Mikroorganismen oder Ihren Antigenen. 1-Mitt. : Der Gündversuch zur Schutzimpfung der Mans gegen eine Enteritis-Infektion. - Zbl.Bakt.I.Abt.Orig., 1964, 193, (398-410).
- 327 - RAETTIG H. - Orale Immunisierung mit nichtvermehrungsfähigen Mikroorganismen oder Ihren Antigenen. 2-Mitt. : Experimente zur unspezifischen Schutzimpfung bei der Enteritis-Infektion der Mans. - Zbl.Bakt.I.Abt.Orig., 1965, 197, (368-388).
- 328 - RAETTIG H. - Neue Modellversuche zu Infektabwehr des Darmes.
- Zbl. Bakt. I. Abt. Orig., 1965, 198, (206-211).

- 329 - RAETTIG H. - Therapie and Prophylaxe der Salmonella ausscheidung durch orale Immunisierung. - Zbl. f. Bakt. I. Orig., 1967, 205, (439).
- 330 - RAETTIG H., MAMSCH R. - Oral vaccination against shigellosis by means of heat killed bacteria. - Arch. Immunol. Ther. exp., 1968, 16, (324).
- 331 - RAETTIG H. - Orale Immunisierung mit nichtvermehrungsfähigen Mikroorganismen oder Ihren Antigenen. 10-Mitt.: Serologische Primär und Sekundärantwort nach oraler Impfung mit S.typhimurium Vollantigen in vergleichenden Tier experiment. - Zbl. Bakt. I. Orig., 1970, 214, (216).
- 332 - RAETTIG H. - Mechanisms of oral immunization with inactivated microorganisms. - Progr. Immunobiol. Stand., 1970, 4, (337-346).
- 333 - RAETTIG H. - Die Orale Impfung mit inaktivierten Mikroorganismen Zehn Jahre Forschungsarbeit im Robert KOCH-Institut. - Bundesgesundheitsblatt 14, 1971, 11, (141-147).
- 334 - RAETTIG H. - Aktuelle Erfolge der oralen Immunisierung. - Münch Med. Wschr., 1971, 113, (671-677).
- 335 - RAETTIG H. - L'immunisation "locale" au moyen de microorganismes inactivés cent ans après la naissance de Besredka. - Bull. Inst. Pasteur, 1971, 69, (91-97).
- 336 - RAETTIG H. - Combined vaccines from inactivated enterobacteriaceae for oral application. - Progr. Immunobiol. Stand., 1971, 15, (49-55).
- 337 - RAETTIG H. - Oral live and inactivated typhoid vaccines. - Progr. Immunobiol. Stand., 1972, 5, (366-368).
- 338 - RAETTIG H., STEFFEN R. and SCHUBERT I. - Oral immunization with non-viable microorganisms or their antigens 16-Communication : Time kinetics of the protection after vaccination. - Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig., 1973, A225, (263-272).
- 339 - RAETTIG H. - Orale Immunisierung mit nichtvermehrungsfähigen Mikroorganismen oder Ihren Antigenen. 18-Mitt.: Lagerungsfähigkeit von lyophilisierten Oral impfstoffen. - Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig., 1974, 229, (117-126).
- 340 - RAMBAUD J.C. - Immunoglobulines du tube digestif. - Arch. Fr. Mal. App. Dig., 1972, 61, (586-590).
- 341 - RAUSS K., KETIYI J. - Serum and coproantibodies in mice immunized per orally with Shigella flexneri. - Zschr. f. Immunfshg. 1964, 127, (37).
- 342 - RAUSS K., KETIYI I., MATUSOVITS E., SZENDREI L., VERTENYI A. and VARBIRO B. - Specific oral prevention of infantile enteritis. - Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung., 1972, 19, (19-28).
- 343 - REDEY B. - Self-experiments with ingestion of various bacteria. - Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung., 1974, 21, (45-62).
- 344 - REED W.P. and RALPH C. - Intestinal immunoglobulins in shigellosis. - Gastroenterology, 1971, 61, (35-45).
- 345 - REITER H. - Versuche über perorale Immunisierung. - Dtsche. Med. Wschr., 1926, 946.

- 346 - REITMAN M. - Infectivity and antigenicity of streptomycin-dependent Salmonella typhosa. - J. Infect. Dis., 1967, 117, (101-107).
- 347 - RESSLER N. - Two-dimensional electrophoresis of serum protein antigens in an antibody containing buffer. - Clin. Chim. Acta, 1960, 5, (795).
- 348 - REYNOLDS H.Y., JOHNSON J.S. - Canine immunoglobulins. IV - Copro immunoglobulins. - J. Immunol., 1970, 104, (888-895).
- 349 - REYNOLDS H.Y. and JOHNSON J.S. - Canine immunoglobulins. III - Distribution of immunoglobulins in colostrum and isolation of secretory IgA and 7S γ ₁. - J. Immunol. 1970, 104, (1000-1008).
- 350 - REYNOLDS H.Y. and JOHNSON J.S. - Quantitation of canine immunoglobulins. - J. Immunol., 1970, 105, (698-703).
- 351 - REYNOLDS H.J. and JOHNSON J.S. - Canine copro-immunoglobulins. - J. Infect. Dis., 1970, 121, (suppl.), (118).
- 352 - RICARDO M.J., BREWER J.M. and INMAN F.P. - The molecular weight of J chain derived from human IgM. - Biochem. J., 1974, 137, (71-77)
The incorporation of J chain into reassembled human IgM. -Biochem.J.,1974,137, (79)
- 353 - RICHMAN D.D., MURPHY B.R., TIERNEY E.L. and CHANOCK R.M. - Specificity of the local secretory antibody to influenza A virus infection. - J. Immunol., 1974, 113, (1654-1656).
- 354 - RICKS J., ROBERTS M. and PATTERSON R. - Canine secretory immunoglobulins. Identification of secretory component. - J. Immunol., 1970, 105, (1327-1333).
- 355 - RISTIC M., ABOUAAYOUSSEF M.H. - Comments on the immunology of transmissible gastroenteritis. - J. Amer. Vet. Med. Ass., 1972, 160, (549-553).
- 356 - ROCKEY J.H., HANSON L.A., HEREMANS J.F. et KUNKEL H.G. - β -2A aglobulinemia in two healthy men. - J. Lab. Clin. Med., 1964, 63, (205-212).
- 357 - ROSSEN R.D., SOUTH M.A. and BUTLER W.T. - Localization of external secretory IgA piece by immunofluorescence in tissues from patients with agammaglobulinemia. - Prot. Biol. Fl. (16 th Coll.) H. Peeters, ed., Pergamon Press. NY, 1968.
- 358 - ROSSEN R.D., MORGAN C., HSU K.C., BUTLER W.T. and ROSE H.M. - Localization of 11S external secretory IgA by immunofluorescence in tissues lining the oral and respiratory passages in man. - J. Immunol., 1968, 100, (706-717).
- 359 - ROSSEN R.D., SHADE A.L., BUTLER W.T. and KASEL J.A. - The protein in nasal secretions : A longitudinal study of the γ A globulin, γ G globulin, albumin side-rophilline and total protein concentration in nasal washing from adult male volunteers. - New. J. Clin. Invest., 1966, 45, (768-776).
- 360 - ROTHBERG R.M., KRAFT S.C., ASQUITH P. and MICHALEK S.M. - The effect of splenectomy on the immune responses of rabbits to a soluble protein antigen given parentally or orally. - Cell. Immunology, 1973, 7, (124-133).
- 361 - ROUSE B.T. and INGRAM D.G. - The total protein and immunoglobulin profile of equine colostrum and milk. - Immunology, 1970, 19, (901-907).
- 362 - RUBTSOV I.V., BELAYA Y.A., MELNIK E.G. and BERLIN Z.I. - Concerning the specific dysentery vaccination with the live attenuated vaccine per os. - Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol., 1970, 47, (58-63).

- 363 - SALETTI M., PANERO C., GENNA G. and MORGESE G. - Titolo in agglutinine e potere protettivo del siero di soggetti trattati per via orale con vaccino antitifico-paratifico. - *Ann. Sclavo*, 1968, 10, (95-113).
- 364 - SALETTI M., PANERO C., GENNA G., RIPARBELLI G., MORGESE G. - Ricerche sperimentali con vari tipi di vaccino tifico somministrato per via orale, nell'animale e nell'omo. - *Progr. Immunobiol. Stand.*, 1970, 4, (372-379).
- 365 - SATISH MEHTA K., PLAUT A.G., CALVANICO N.J. and TOMASI T.B. - Human IgA : Production of an Fc fragment by an enteric microbial proteolytic enzyme. - *J. Immunol.*, 1973, 111, (1274-1276).
- 366 - SCHEIDEGGER J.J. - Une microméthode d'immunoélectrophorèse. - *Int. Arch. Allerg.*, 1955, 7, (103).
- 367 - SCHMUDDE R. - Vergleichende orale, nasale und rektale Impfung von Mäusen mit inaktivierten *S.typhimurium*-Bakterien mit und ohne Dimethylsulfoxyd-Zugabe. - *Inaug. Diss. Berlin*. 1968.
- 368 - SCHOFIELD G.C. and ATKINS A.M. - Secretory immunoglobulin in columnar epithelial cells of the large intestine. - *J. Anat.*, 1970, 107, (491).
- 369 - SCHROHENLOHER R.E., MESTECKY J. and STANTON T.H. - Molecular weight of a human J. chain. - *Biochim. Biophys. Acta.*, 1973, 295, (576).
- 370 - SELL S. - Isolation and characterization of rabbit colostrai IgA. - *Immunochemistry*, 1967, 4, (49-55).
- 371 - SEON B.K., YAGI Y. and PRESSMAN D. - Monoclonal IgA and IgM in the serum of a single patient (S-C). II - Identity of light chains from IgA (K) and IgM (K). - *J. Immunol.*, 1973, 110, (345-349).
- 372 - SHUBERT D. - Immunoglobulin biosynthesis. IV - Carbohydrate attachment to Ig subunits. - *J. Molec. Biol.*, 1970, 51, (287-301).
- 373 - SHUSTER J. - Pepsin hydrolysis of IgA - Delineation of two populations of molecules. - *Immunochemistry*, 1971, 8, (405-411).
- 374 - SKVARIL F. and RADL J. - Quantitative estimation of human immunoglobulins. I - Estimation of IgG, IgA and IgM by the method of simple radial immunodiffusion. - *J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunobiol.*, 1969, 13, (107-117).
- 375 - SMITH H.W. and GYLES C.L. - The relationship between two apparently different enterotoxines produced by enteropathogenic strains of *E.coli* of porsein origin. - *J. Med. Microbiol.*, 1970, 3, (387-401).
- 376 - SMITH H.W. and GYLES C.L. - The effect of cell-free fluids prepared from cultures of human and animal enteropathogenic strains of *E.coli* on ligated intestinal segments of rabbits and pigs. - *J. Med. Microbiol.*, 1970, 3, (403-409).
- 377 - SMITH J.W., HAND W.L. and SANFORD J.P. - Synthesis and secretion of local immunoglobulin by intestinal tract of newborn rabbits. - *J. Infect. Dis.*, 1971, 124, (494-498).
- 378 - SOUTH M.A., WOLLHEIM F.A., COOPER M.D. and GOOD R.A. - Selective transport of IgA and its biologic significance of human saliva. - *Fed. Proc.*, 1965, 24, (502).

- 379 - SOUTH M.A., COOPER M.D., WOLLHEIM F.A., HONG R. and GOOD R.A. - The IgA system. I - Studies of the transport and immunochemistry of IgA in the saliva. - J. Exp. Med., 1966, 123, (615).
- 380 - SOUTH M.A., COOPER M.D., HONG R. and GOOD R.A. - The IgA antibody system. - Curr. Top. Dev. Biol., 1967, 2, (191-222).
- 381 - SOUTH M.A., WARWICK W.J., WOLLHEIM F.A. and GOOD R.A. - The IgA system. III - IgA levels in the serum and saliva of pediatric patients. Evidence for a local immunological system. - J. Pediat., 1967, 71, (645-653).
- 382 - SOUTH M.A., COOPER M.D., WOLLHEIM F.A. and GOOD R.A. - The IgA system. II - The clinical significance of IgA deficiency. Studies in patients with agammaglobulinemia and ataxia-telangiectasia. - Am. J. Med., 1968, 44, (168-178).
- 383 - SOUTH M.A., FIGUERO M., ROSSEN R.D., BUTLER W.R. and RAWLS W.E. - The biologic significance of IgA in the mucous secretions. Response to oral poliovirus vaccine in IgA deficient subjects. - Prot.Biol.Fluids. Proceed XVI Coll. Brugge Belg., 1969, p.315, Pergamon Press.
- 384 - SOUTH M.A. - IgA in neonatal immunity - Am. of the N.Y. Acad. Sc., 1971, 176, (40-48).
- 385 - SPECTOR D.S. - Immunoglobulins in the newborn. - Lancet, 1968, 7538, (360-361).
- 386 - STEINBUCH M., AUDRAN R. and REVEGE C. - Proteolytic digestion and chemical cleavage of human IgA. - Prog. Immunobiol. Stand., 1970, 4.
- 387 - STERNE and TRIM - The effects of non specific agents and route of administration on the biological assay of Salmonella typhi vaccines. - Progr. Immunobiol. Stand., 1971, 15, (93-98).
- 388 - STEWART M.W. - Resistance of rabbit secretory IgA to proteolysis. - Biochim. Biophys. Acta, 1971, 236, (440-449).
- 389 - STROBER W., BLAESE R.M. and WALDMANN T.A. - The origin of salivary IgA. - J. Lab. Clin. Med., 1970, 75, (856-862).
- 390 - SUAU E., FEDOU R. - Phénomènes immunitaires au niveau des muqueuses. - Rev. Med. Toulouse, 1973, 9, (927-947).
- 391 - SULLIVAN A.L., PRENDERGAST R.A., ANTUNES L.J., SILVERSTEIN A.M. and TOMASI T.B. - Characterization of the serum and secretory immune systems of the cow and sheep. - J. Immun., 1969, 103, (334-344).
- 392 - SVEHAG S.E. and BLOTH B. - Ultrastructure of secretory and high-polymer serum immunoglobulin A of human and rabbit origin. - Science, 1970, 168, (847-849).
- 393 - SWANSON V. - Absence of IgA in serum with presence of IgA containing cells in intestinal tract. - Clin. Research, 1968, 16, (119).
- 394 - SZCZEPISKI O., WLODARCZAK K., WALCZAK M., WALTER Z. and KLAUZINSKI R. - Immunoglobulins level in saliva of children with poliomyelitis and of healthy children after oral vaccination with live attenuated poliovirus strains type 2 and 3. - Pol. Med. J., 1970, 9, (1168-1172).
- 395 - TAYLOR K.B. - Role of immune responses in the gastro intestinal tract. - Fed. Proc., 1965, 24, (23-28).

- 396 - TERZIN A.L. - An account of field trials with a live oral vaccine against bacillary dysentery in men.
- Progr. Immunobiol. Stand., 1971, 15, (205-212).
- 397 - THIERY J.P. - Ultrastructures et fonctions cellulaires impliquées dans la réaction immunitaire. - Bull. Soc. Chim. Biol., 1968, 50, (1077-1100).
- 398 - THIERS H., MOULIN G., FAYOLLE J., RACOUCHOT J., LEVRAT R., CLAUDY A. - Pyoderma gangrenosum with decrease of IgA secretion in hemorrhagic rectocolitis.
- Lyon Med., 1971, 225, (1269-1270).
- 399 - THILO W., SEEGER E. and SCHLOSSHARDT J. - Efficacy testing of oral bacterial vaccines by localized haemolysis in gel.
- Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung., 1974, 21, (41-44).
- 400 - THOMSON R.A., ASQUITH P. and COOKE W.T. - Secretory IgA in the serum.
- Lancet, 1969, ii, (517-519).
- 401 - THOMSON R.A. and ASQUITH P. - Quantitation of exocrine IgA in human serum in health and disease. - Clin. Exp. Immun., 1970, 7, (491-500).
- 402 - TOMANA M., MESTECKY J. and NIEDERMEIER W. - Studies on human secretory immunoglobulin A. IV - carbohydrate composition. - J. Immun., 1972, 108, (1631-1636).
- 403 - TOMASI T.B. and ZIGELBAUM S. - The selective occurrence of gamma A globulins in certain body fluids. - J. Clin. Invest., 1963, 42, (1552-1560).
- 404 - TOMASI T.B., TAN E.M., SOLOMON A. and PRENDERGAST R.A. - Characteristics of an immune system common to certain external secretions.
- J. Exp. Med., 1965, 121, (101-124).
- 405 - TOMASI T.B. and CZERWINSKI D.S. - The secretory IgA system in immunologic deficiency diseases in man.
- The National Foundation Bergsuna D. (ed) N.Y., 1968, 4, (270-275).
- 406 - TOMASI T.B. and BIENENSTOCK J. - Secretory immunoglobulins.
- Adv. Immunol., 1968, 9, (1-96).
- 407 - TOMASI T.B. and CALVANICO N. - Human secretory γ A.
- Fed. Proc., 1968, 27, (617).
- 408 - TOMASI T.B. - Human immunoglobulin A.
- N. Engl. J. Med., 1968, 279, (1327-1330).
- 409 - TOMASI T.B. - Structure and function of mucosal antibodies.
- Ann. Rev. Med., 1970, 21, (281-295).
- 410 - TOMASI T.B. - Secretory immunoglobulins.
- New. Engl. J. Med., 1972, 287, (500-506).
- 411 - TOURVILLE D.R., ADLER R.H., BIENENSTOCK J. and TOMASI T.B. - The human secretory immunoglobulin system : immuno histological localization of gamma A, secretory "piece" and lactoferrin in normal human tissues.
- J. Exp. Med., 1969, 129, (411-429).
- 412 - TRIAU R., AYME G., DOMIKIAN R., MYNARD M.C. et VALETTE L. - Essais de préparation d'un orovaccin anticolibacillaire et contrôles de laboratoire.
- Progr. Immunobiol. Stand., 1970, 4, (380-385).
- 413 - TWOMEY J.J., JORDAN P.H., LAUGHTER A.H., HEUWISSEN H.J., GOOD R.A. - The gastric disorder in immunoglobulin deficient patients. - Ann.Intern.Med., 1970, 72, (499).

- 414 - UEHLING D.T. - Secretory in seminal fluid
- Fertil. Steril., 1971, 22, (769-773).
- 415 - UNDERDOW B.J. - Studies on the subunit structure of rabbit secretory IgA.
- J. Immunol., 1972, 109, (227-237).
- 416 - VAERMAN J.P. and HEREMANS J.F. - The immunoglobulins of the dog. I - Identification of canine immunoglobulins homologous to human immunoglobulins A and IgM.
- Immunochemistry, 1968, 5, (425-432).
- 417 - VAERMAN J.P. and HEREMANS J.F. - The immunoglobulins of the dog. II - The Ig of canine secretions. - Immunochemistry, 1969, 6, (779-786).
- 418 - VAERMAN J.P. and HEREMANS J.F. - Distribution of various immunoglobulin containing cells in canine lymphoid tissue. - Immunology, 1969, 17, (627-633).
- 419 - VAERMAN J.P., HEREMANS J.F. and VAN KERCKHOVEN G. - Identification of IgA in mamalian species. - J. Immunol., 1969, 103, (1421-1422).
- 420 - VAERMAN J.P. - Studies on IgA immunoglobulins in man and animals.
- Thèse déposée en vue de l'Obtention du grade d'Agrégé de l'Enseignement Supérieur. LOUVAIN, 1970.
- 421 - VAERMAN J.P., CRABBE P.A., NASH D.R. and HEREMANS J.F. - Quantitative and immunohistochemical studies on dog's immunoglobulins.
- Progr. Immunobiol. Stand. , 1970, 4, (193-198).
- 422 - VAERMAN J.P. and HEREMANS J.H. - Origin and molecular of IgA in the mesenteric lymph of the dog. - Immunology, 1970, 18, (27-37).
- 423 - VAERMAN J.P., QUERINJEAN P. and HEREMANS J.F. - Studies on the IgA system of the horse. - Immunology, 1971, 21, (443-454).
- 424 - VAERMAN J.F. and HEREMANS J.F. - IgA and other immunoglobulins from the european hedgedog. - J. Immun., 1971, 107, (201-211).
- 425 - VAERMAN J.P. and HEREMANS J.F. - The IgA system of the guinea pig.
- J. Ummun., 1972, 108, (637-648).
- 426 - VAERMAN J.P. - Propriétés physicochimiques des IgA humaines.
- Ann. Immunol., 1973, 124c, (290-302).
- 427 - VAN FURTH R. and AIUTI F. - Immunoglobulin synthesis by tissues of the gastrointestinal and respiratory tract. - Prot.Biol.Fluids, 1968, 16, (479-484).
- 428 - VAN MUNSTER P.J.J., STOELINGA G.B.A. and POELS-ZANDERS S.- Evidence of immunological differences between free and bounds secretory piece.
- Immunology, 1969, 17, (165-174).
- 429 - VAN MUNSTER P.J.J., STOELINGA G.B. and POELS-ZANDERS S. - Isolation of free secretory component (S.C.) from human milk, determination of its molecular weight.
- Immunochemistry, 1971, 8, (471-477).
- 430 - VAN MUNSTER P.J.J., STOELINGA G.B.A., CLAMP J.R., GERDING J.J.T., REIJNEN J.C.M. and VOSS M. - The molecular weight and the amino acid carbonhydrate compositions of free secretory component. - Immunology, 1972, 24, (249-256).
- 431 - VELDKAMP J., RUTH VAN DER GAAG and WILLERS J.M.N. - The role of peyer's patch cells in antibody formation. - Immunology, 1973, 25, (761-771).

- 432 - VENNEMAN M.R. and BIGLEY N.J. - Isolation and partial characterization of an immunogenic moiety obtained from Salmonella typhimurium.
- J. Bact., 1969, 100, (140-148).
- 433 - VOLKHEIMER G. - Silting-effect. - Deutsch.Z.Verd.Stoffwechselks, 1964, 24, (48-51).
- 434 - VOLKHEIMER G., SCHULZ F.H. and AURICH I. - Persorption of particles.
- Digestion, 1968, 1, (78-80).
- 435 - WADDELL A.H., JARRETT W.F.H. and MURRAY M. - The influence of sex on intestinal immunological reactions : The effect of gonadectomy on worm expulsion in rats infected with nippostrongylus brasiliensis.
- Res. Vet. Sci., 1971, 12, (396-389).
- 436 - WADMANT R.H., GADOL N., SPENCER C. and JOHNSON J.E. - Cell-mediated immunity on secretory surfaces. - J. Nat. Med. Ass., 1972, 64, (250-251).
- 437 - WALDMAN R.H., MACH J.P., STELLA M.M. and ROWE D.S. - Secretory IgA in human serum. - J. Immunol., 1970, 105, (43-47).
- 438 - WALDMAN R.H., WIGLEY E.M. and SMALL P.A. - Specificity of respiratory secretory antibody against influenza virus. - J. Immunol., 1970, 105, (1477-1483).
- 439 - WALDMAN R.H. - Local mucosal immunity. - Amer. J. Med.Sci., 1970, 260, (255-260).
- 440 - WALDMAN R.H. - L'IgA et l'immunité cellulaire au cours de l'immunisation locale.
- Bull. Inst. Pasteur, 1971, 69, (79-90).
- 441 - WALDMAN R.H., GRUNSPAN R. and SENTERFITT V. - Oral immunization of mice with killed Salmonella typhimurium vaccine.
- Progr. Immunobiol. Stand., 1971, 15, (99-102).
- 442 - WALDMAN R.H., JURGENSEN P.F., OLSEN G.N., GANGULY R. and JOHNSON J.E. - Immune response of the human respiratory tract. I - Immunoglobulin levels and influenza virus vaccine antibody response. - J. Immunol., 1973, 111, (38-41).
- 443 - WALSH T.E. and CANNON P.R. - Immunization of the respiratory tract. A comparative study of the antibody content of the respiratory and other tissues following active, passive and regional immunization.
- J. Immunol., 1938, 35, (31-46).
- 444 - WARNER N.L., UHR J.W., THORBECKE G.J. and OVARY Z. - Immunoglobulins, antibodies and the bursa of fabricius-induction of agammaglobulinemia and the loss of all antibody-formi capacity by hormonal bursectomy.
- J. Immu., 1969, 103, (1317-1330).
- 445 - WATANABE H. and KOBAYASHI K. - Peculiar secretory IgA system identified in chickens. - J. Immunol., 1974, 113, (1405-1409).
- 446 - WATSON D.W. - Immune responses and the gut.
- Gastroenterology, 1969, 56, (944-965).
- 447 - WATSON D.L. and LASCELLES A.R. - IgA in the body fluids of sheep and cattle.
- Res. Vet. Sci., 1971, 12, (503-507).
- 448 - WERNET T.P., BREU H., KNOP J. and ROWLEY D. - Antibacterial action of specific IgA and transport of IgM, IgA, IgG from serum in to small intestine.
- J. Infect. Dis., 1971, 124, (223-226).

- 449 - WILSON I.D., ONSTAD G.R., WILLIAMS R.C. and CAREY J.B. - Selective immunoglobulin A deficiency in two patients with alcoholic cirrhosis.
- Gastroenterology, 1968, 54, (253-259).
- 450 - WILSON I.D. and WILLIAMS R.C. - Two distinct groups of immunoglobulin A revealed by peptic digestion. - J. Clin. Invest., 1969, 48, (2409).
- 451 - WILSON I.D., SOLTIS R.D. and WILLIAMS R.C. - Naturally occurring human antibodies to pepsin-digested IgA. - Blood, 1970, 36, (390).
- 452 - WILSON I.D. - Studies on the products of peptic digestion of IgA.
- Immunology, 1971, 20, (327-339).
- 453 - WILSON I.D. - WILSON I.D. - Human serum antibodies specific for secretory IgA.
- Immunology, 1972, 22, (1001-1010).
- 454 - WOLF K. - Die Immunisierung per os.
- Mäuch.Med. Wschr., 1908, 270.
- 455 - WOLFENSTEIN C., FRANGIONE B., MIHAESCO E. and FRANKLIN E.C. - Structure of IgA. I - Interchain disulfide of a γ A myeloma protein.
- Biochemistry, 1971, 10, (4140).
- 456 - WRIGLEY C.W. - Gel electrofocusing. A technique for analyzing multiple protein samples by isoelectric focusing.
- Sci. Tools, Sweden, 1968, 15, (17-23).
- 457 - WRIGLEY C.W. - Protein mapping by combined gel electrofocusing and electrophoresis : application to the study of genotypic variations in wheat gliadins.
- Biochem. Genet. USA, 1970, 4, (509).
- 458 - YAGI Y. and PRESSMAN D. - Monoclonal IgA and IgM in the serum of a single patient (S.C.). I - Sharing of individually specific determinants between IgA and IgM.
- J. Immunol., 1973, 110, (335-344).
- 459 - YOKOYAMA M. and YAMAKIDO M. - Direct immunodiffusion technique for Ig quantitation. - Clin. Chim. Acta, 1969, 23, (165-167).
- 460 - YOON SE KANG N., CALVANICO J. and TOMASI T.B. - Human-J chain : Isolation and molecular weight studies. - J. Immunol., 1974, 112, (162-167).
- 461 - YOSHIDA E. - Über Immunisierung per os.
- Arch. f. Hyg., 1909, 69, (21).
- 462 - ZSCHOCKE R.H., GRIEBLE H.G., BACH G.L. and ANDERSON T.O. - Studies on IgA : I - Fractionation procedure for isolation of IgA from pooled normal human plasma. - J. Immunol., 1969, 102, (625-637).

- 463 - DUSHKIN V.A., PODOPRIGORA G.I., INTIZAROV M.M. - Les différentes classes d'immunoglobulines du tractus intestinal de la souris après contamination par E. coli. (en russe) - Biol. Exper. Bnol., 1974, 11, (74-76).
- 464 - GERMANIER R. and FURER E. - Immunity in experimental salmonellosis. II - Basis for the avirulence and protective capacity of gal E mutants of Salmonella typhimurium. - Infect. Immun., 1971, 4, (663-673).
- 465 - GERMANIER R. - Immunity in experimental salmonellosis. III - Comparative immunization with viable and heat inactivated cells of Salmonella typhimurium. - Infect. Immun., 1972, 5, (792-797).
- 466 - GERMANIER R. and FURER E. - Isolation and characterisation of Gal/E mutant Ty 21a of Salmonella typhi i a candidate strain for a live oral typhoid vaccine. - J. Infect. Dis., 1975, 131, (553-558).
- 467 - WARDLAW A.C. - Endotoxin and complement substrate in "Bacterial endotoxins" LANDY M. and BRAUN W. edit., Rutgers University Press, New Brunswick, N.J., 1964, (81-88).

TABLE DES MATIERES

	<u>Pages</u>
INTRODUCTION	1
<u>PREMIERE PARTIE : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE</u>	
<u>CHAPITRE I</u> : Technologie et résultats de la vaccination par voie orale contre les entérobactéries	5
I - TECHNOLOGIE DE LA VACCINATION PAR VOIE ORALE	6
1) Espèces utilisées	6
2) Le vaccin	6
a) Forme du vaccin	6
b) Nature du vaccin	11
. bactéries inactivées	11
. bactéries vivantes	11
. des antigènes	12
c) Quantités administrées	13
d) Rythme de vaccination	13
3) Contrôle de l'efficacité du vaccin	13
a) Chez l'homme	13
. Essais contrôlés sur le terrain	13
. Epreuves sur volontaires	14
b) Chez l'animal	14
II - RESULTATS	15
1) Affections typhoïdiques	16
2) Shigelloses	16
3) Choléra	17
4) Entérites à Escherichia coli	18
CONCLUSION	19
<u>CHAPITRE II</u> : L'immunité intestinale. Importance des immunoglobulines sécrétoires	20
I - DESTINEE DE L'ANTIGENE ABSORBE	21
II - MECANISME DE L'IMMUNITE INTESTINALE	22
1) Les moyens de défense non spécifiques	22
2) Les moyens de défense spécifiques	24
III - LES IMMUNOGLOBULINES SECRETOIRES	25
1) Généralités et structure des différentes immunoglobulines	25
2) Les immunoglobulines de sécrétion	27
IV - STRUCTURE DES IgAs	27
A) Propriétés comparées des IgA sécrétoires et des IgA sériques ...	29
1) Propriétés structurales	29
2) La pièce sécrétoire "SP"	29
a) Structure de SP	29
b) Place de SP dans l'IgAs	30
c) Propriétés de SP	30
3) La pièce "J"	32
B) Composition chimique de l'IgAs	33
C) Ultrastructure et représentation schématique de l'IgAs	34

	<u>Pages</u>
V - SYNTHÈSE DES IgAs	34
1) Existence d'un système sécrétoire local	34
2) Lieu de synthèse des IgAs	36
a) Rôle des plasmocytes	36
b) Synthèse des constituants de l'IgAs	38
3) Origine des plasmocytes à IgA	38
4) Cinétique de la synthèse	39
VI - DESTINÉE DE L'IgA SECRÉTÉE	40
. Première voie	40
. Deuxième voie	40
1) Lieu d'association de l'IgA et de SP	40
2) Les différents schémas proposés	42
a) L'hypothèse de TOURVILLE (411)	42
b) En 1973. COMOGLIO (99)	42
c) Allen PORTER (8)	42
VII - PROPRIÉTÉS DES IgAs	46
1) Résistance à la protéolyse	46
2) Activité anticorps	46
3) Spécificité de l'IgAs	47
4) L'IgAs, protéine sérique	47
VIII - DOSAGE DES IMMUNOGLOBULINES	48
1) Méthodes électrophorétiques	48
a) Electrophorèse libre	48
b) Electrophorèse de zone	48
2) Méthodes chromatographiques	49
a) La chromatographie d'exclusion	49
. Le Séphadex G-200	49
. Le Séphadex G-150	50
. Le Biogel P-200	50
. Le Biogel A 5 M	50
. Le Biogel A 0,5 M	50
. L'Indubiose Ac-A 2.2	50
b) La chromatographie par échanges d'ions	50
3) Méthodes immunochimiques	51
a) Immunodiffusion	51
b) Electroimmunodiffusion	52
c) L'immunofluorescence	53
DEUXIÈME PARTIE : TRAVAUX PERSONNELS	54
<u>CHAPITRE I</u> : Etude de la protection de la souris après vaccination par voie orale à l'aide d'une bactérie pathogène tuée, d'une bactérie avirulente vivante et d'une fraction antigénique	55
I - MATÉRIEL ET MÉTHODES	56
1) Animaux	56
2) Vaccins	56
a) Souche pathogène inactivée	56
b) Souche avirulente vivante	57
c) Antigène vaccinant	58
3) Protocole de vaccination	60
a) Vaccin tué	60
b) Vaccin vivant avirulent	60
c) Antigène vaccinant	60
4) Epreuve	61

	<u>Pages</u>
II - RESULTATS	61
1) Vaccin tué	61
a) Etude des caractères biochimiques de <u>Salmonella typhimurium</u> souche C5S	61
b) Etude du pouvoir létal de <u>Salmonella typhimurium</u> C5S administré par voie orale à différentes doses	64
c) Etude de la protection obtenue après vaccination par voie orale à l'aide de <u>Salmonella typhimurium</u> C5S inactivée	65
d) Influence du délai d'administration de l'épreuve sur le taux de survie	67
2) Vaccin vivant	70
a) Etude des caractères biochimiques de <u>Salmonella typhimurium</u> souche M 206	70
b) Etude du pouvoir létal de <u>Salmonella typhimurium</u> souche M206 administrée par voie orale à différentes doses	71
c) Etude de la protection obtenue après vaccination par voie orale à l'aide de <u>Salmonella typhimurium</u> souche M 206 vivante.	71
d) Influence du délai d'administration de l'épreuve sur le taux de survie	74
e) Efficacité comparée du vaccin tué et du vaccin vivant	75
f) Contrôle supplémentaire de la virulence de la souche C5S de <u>Salmonella typhimurium</u>	77
3) Antigène vaccinant	77
a) Etude du pouvoir protecteur des différentes fractions administrées par voie intrapéritonéale	77
b) Etude du pouvoir protecteur des fractions IV et VI après vaccination par voie orale	78
III - DISCUSSION	79
IV - CONCLUSION	82
 CHAPITRE II : Etude de la variation du taux des immunoglobulines intestinales et sériques après vaccination par voie buccale	 83
INTRODUCTION	84
MATERIEL ET METHODES	84
1) Animaux	84
2) Prélèvements	88
a) Sérum	88
b) Sécrétions intestinales	88
3) Dosage des protéines	88
4) Analyse chromatographique	89
a) Préparation des gels	91
b) Remplissage des colonnes	91
c) Dépôt des échantillons	91
d) Elution	91
5) Analyse électrophorétique	92
a) Electrophorèse	92
b) Immunoélectrophorèse	92
6) Immunodiffusion	93
a) Immunodiffusion double	93
b) Immunodiffusion radiale	94
7) Isoélectrofocalisation	94
8) Dosage des anticorps hémagglutinants	95
a) Réactifs	95
b) Préparation du lipopolysaccharide activé	96
c) Préparation des hématies tannées	96

d) Sensibilisation des hématies	96
e) Réaction d'hémagglutination	96
9) Contrôles histologiques	97
a) Prélèvements intestinaux	97
b) Réaction immunologique	97
c) Coloration des coupes	97
RESULTATS	98
1°) DOSAGE DES PROTEINES	98
2°) FRACTIONNEMENT DES IMMUNOGLOBULINES SERIQUES ET INTESTINALES PAR CHROMATOGRAPHIE D'EXCLUSION	98
a) Choix du gel	98
b) Résultats obtenus avec les liquides de lavages intestinaux .	98
c) Résultats obtenus avec les sérums	102
3°) ANALYSE ELECTROPHORETIQUE	102
a) Electrophorèse	102
b) Immunoélectrophorèse	102
4°) ISOELECTROFOCALISATION	110
5°) IMMUNODIFFUSION	110
a) Immunodiffusion double d'OUCHTERLONY	110
b) Immunodiffusion radiale de MANCINI	112
6°) CONTROLE HISTOLOGIQUE	121
DISCUSSION	121
CONCLUSION	126

TROISIEME PARTIE : DISCUSSION GENERALE ET CONCLUSIONS

Discussion générale	128
Conclusions	135

BIBLIOGRAPHIE	I à XXIX
---------------------	----------



